



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE INULINA EN CEBOLLA
MORADA (*Allium cepa*) Y SU PROPUESTA COMO
FUENTE NATURAL DE ESTE PREBIÓTICO

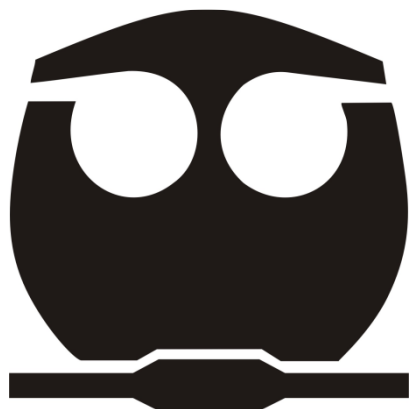
T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

GUERRERO DE LA O JOSE RODRIGO



MEXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente	M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Marco Antonio León Félix
Secretario	Lucia Cornejo Barrera
1er Suplente	M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas
2do Suplente	Juan Diego Ortiz Palma

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor: M. en C. Bernardo Lucas Florentino _____

Supervisor Técnico: M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas _____

Sustentante: José Rodrigo Guerrero De La O _____

Esta tesis forma parte del Proyecto PAPIIT IN203008 "Influencia de la inulina en el tiempo de recuperación y desaparición de los cambios bioquímicos y estructurales producidos en ratas jóvenes desnutridas".

Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a Dios por haberme dado la posibilidad de llegar hasta donde me encuentro y dado la capacidad de cumplir mi objetivo, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por haberme proporcionado los conocimientos y las bases necesarias para mi futuro desempeño y por haber convertido mi mente y mi corazón en un eterno Puma.

Gracias a mi padre Rubén y a madre Guillermina y, por qué no, a mi hermana TT-13 que sin su ayuda y cariño en situaciones altas y bajas, en circunstancias complicadas y momentos alegres y especiales no hubiera podido lograr lo que tengo. Envío agradecimientos a mi tía Monsy y su familia por ratos gratos con ustedes, a mi tía Rosa por su entusiasmo.

Gracias a la profesora Arge por ejercer presión en mí y al profesor Bernardo por su ayuda tan valiosa y su conocimiento que me brindó durante mucho tiempo. Agradezco a todos mis compas del Lab 111 por el cotorreo y bromas que aliviaron aquellos momentos tensos. Agradezco al Proyecto por permitirme formar parte.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi Familia por ser mi impulso, mi inspiración y el reflejo de un gran esfuerzo y apoyo brindado que se potencio en mi interior.

Dedico este trabajo a mis amigos y compañeros Polo, Luigi, Pablo, Kary por grandes ratos y momentos inolvidables. A mi compa de lab “Charles” por el relajo y cambios de rolas y momentos transformados recuerdos. A mi compañera Brenda P., a Ingrid por un darme una gran lección y demás compañeros desde la generación 2002 hasta la generación 2006 porque sin ustedes no hubiera podido llegar a ser **Rod Don Pop**.

Gracias por confiar en mí, gracias por apoyarme, gracias por esto y más. Este es mi logro.

No l TmO aL DsTiNo, St s Mi MuNdO y Lo ReClAmO

INDICE

	Paginas
1. Introducción	7
2. Generalidades	9
2.1 Definición y Composición de Fibra Dietética	10
2.2 Inulina	13
2.3 Métodos de Extracción	16
2.4 Características Generales de la Cebolla	21
2.5 Valor Nutricional de la Cebolla	23
3. Objetivos	24
3.1 Objetivo General	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. Metodología	25
4.1 Muestra	27
4.2 Acondicionamiento	28
4.3 Determinación de Fibra Dietética Total	28
4.4 Extracción de Inulina	33

4.5 Determinación Cuantitativa de Inulina	40
4.6 Métodos Propuestos para la Extracción de Inulina	41
5. Resultados y Discusión	52
5.1 Determinación de Humedad	52
5.2 Determinación de Fibra Dietética Total	53
5.3 Concentración de Glucosa en los Lotes Estudiados	55
5.4 Concentración de Inulina y Glucosa por los Métodos de Extracción y sus Modificaciones	59
5.5 Rendimiento de Extracción	62
5.6 Macro-Extracción con Método de Sistema de Filtraciones con Celita	64
5.7 Costos de Extracción	65
6. Conclusiones	66
7. Bibliografía	68
8. Anexos	71

1. INTRODUCCION

Gran parte del interés general y científico se ha enfocado en el uso de prebióticos como una posibilidad para estimular la presencia de bacterias benéficas, principalmente, bífidobacterias, en el intestino grueso (ciego). Su uso ha sido sugerido en el consumo de alimentos debido a que en las poblaciones parece ser una posibilidad interesante para mejorar la salud y dentro de una de ellas estimular el sistema inmune en el organismo. La inulina es uno de los prebióticos más estudiados en el área nutricional y el más usado en la industria alimenticia para reducir problemas gastrointestinales y cardiovasculares.

La fibra dietética fue menospreciada durante muchos años por los especialistas en nutrición humana; sin embargo, en las últimas dos décadas se ha producido una sorprendente apreciación de la importancia de la fibra dietética para la salud.

La fibra dietética es una mezcla de sustancias orgánicas complejas y que, inicialmente, fue definida como el residuo de células vegetales resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas, se amplió reconociendo la importancia fisiológica y química de la fibra como componente de la dieta.

Las dietas ricas en fibra son preventivas, al mismo tiempo reduce también el riesgo de formación de cálculos biliares, ya que dan como resultado la producción de más sales biliares que promueven la emulsificación del colesterol presente en el organismo. Los alimentos ricos en fibra da mayor capacidad de saciedad, lo que es benéfico para reducir la obesidad; y lo que es más importante aún, una dieta pobre en fibra es causa de estreñimiento y compresión en el tracto intestinal además de ser un factor de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer de colon, estreñimiento, y diverticulosis.

Las anteriores propiedades fisiológicas mencionadas se atribuyen a la presencia de inulina en la fibra dietética soluble, debido a que se considera un hidrato de carbono resistente a la digestión y estas fracciones de dicho componente son metabolizadas solo hasta el intestino grueso por las bacterias simbióticas de la flora normal.

Debido a la importancia que ha cobrado el uso de inulina en la dieta y la necesidad de buscar fuentes alternativas de ésta se pretende aislar de la fibra dietética de la cebolla morada (*Allium cepa*) la fracción correspondiente a la inulina (fructoligosacáridos).

La cebolla morada (*Allium cepa*) se propone como una fuente alternativa para la extracción de inulina debido a que su contenido de dicho prebiótico es alto comparado con otras fuentes vegetales, incluso se encuentra después de la achicoria (*Cichorium intybus*). La cebolla morada tiene un contenido significativo de este fructoligosacárido, por lo que en el presente trabajo se pretende determinar y comparar la cantidad de inulina en diferentes lotes con el fin de proponerla como una fuente potencial de extracción de inulina tomando en consideración el impacto económico. Aunado a lo anterior, México es uno de los principales productores de cebolla morada dentro de América y las condiciones ambientales del territorio nacional son favorables para la producción de esta fuente natural.

2. GENERALIDADES

Durante la época prehispánica, los pueblos indígenas que habitaron el territorio de Mesoamérica tuvieron una dieta basada principalmente en vegetales. De ellos hay que señalar que hay tres especies que se consumieron comúnmente desde el año 3000 a. C., se trata del maíz, el frijol y el chile (Majem, 2006). Al chile, frijol y maíz se asociaban otras especies de no menor importancia, de la cual la cebolla ha trascendido su nativo nicho ecológico para convertirse en un insumo de la más variada alimentación. Las especies vegetales, incluida la cebolla, eran divinizadas en la figura de Chicomecóatl, nombre náhuatl de la diosa mesoamericana de los mantenimientos y alimentos. (Roberts, 2004)

Los componentes prebióticos forman parte de los alimentos funcionales y son definidos como “ingredientes no digeribles que afectan benéficamente al organismo mediante la estimulación del crecimiento y actividad de las bacterias en el colón, mejorando la salud” (Markwart, 1994). Por lo general, los prebióticos son hidratos de carbono no digeribles y forman parte de la composición intrínseca de los alimentos o bien pueden añadirse a los mismos generando alimentos funcionales. (Voragen, 2008)

Dentro de la categoría de alimentos prebióticos se encuentra la inulina formando parte de fructooligosacáridos, que a su vez integra la fibra dietética. Los alimentos prebióticos que mejor definen esta función son los hidratos de carbono similares a la inulina y se usan en la industria alimentaria como sustitutos de azúcares y grasas, suelen aportar a los alimentos textura, estabilizan la formación de espuma, mejoran las cualidades sensoriales (propiedades organolépticas) de los productos lácteos fermentados, galletas, mermeladas, el pan y la leche. (Marlett, 2000)

Los polisacáridos son, en general, la categoría más amplia dentro de los alimentos consumidos y son la mayor fuente de energía. Los carbohidratos, según su solubilidad, se clasifican en:

- a) Polisacáridos Digeribles o Solubles: son los que se encuentran en la dieta y proporcionan energía para realizar las funciones vitales del organismo, además forman retículos donde queda atrapada el agua incrementando la viscosidad de la matriz al ingerirse los alimentos. Dentro de los carbohidratos que aquí se encuentran están los almidones, las sustancias pécticas (como arabinogalactanos, b-glucanos, etc.), mucílagos, gomas (como arábica, guar, etc.), hemicelulosa e inulina y algunos oligosacáridos. (Vela, 2009)
- b) Polisacáridos No Digeribles o Insolubles: son aquellos que no proporcionan energía, son metabolizados por la flora intestinal produciendo beneficios para el organismo, esta conformados principalmente por la fibra dietética y componentes no celulósicos. Retienen el agua en su matriz formando geles de baja viscosidad. Aquí se ubica el resto de los carbohidratos como celulosa, sustancias no amiláceas y sustancias celulósicas. (Blanshard, 1979)

2.1 Definición y Composición de la Fibra Dietética

Los agentes más comunes de los que proporcionan volumen de manera natural en los alimentos son restos de células vegetales resistentes a la hidrólisis enzimática de la digestión. Los agentes de volumen de la fibra dietética son muy importantes en la nutrición humana, puesto que mantienen el normal funcionamiento del tracto gastrointestinal. Incrementan el tamaño del bolo alimenticio y del resto fecal, que disminuye el tiempo de

tránsito intestinal y ayuda a prevenir el estreñimiento. Su presencia en los alimentos induce la sensación de saciedad tras las comidas. (Marlett, 2000)

La fibra alimentaria dietética es una mezcla de hidratos de carbono complejos de alto peso molecular, puede dividirse en dos grupos principales según sus características y propiedades de solubilidad en función del método de extracción. Estos dos tipos son: la fibra insoluble y la fibra soluble. (Vidanarachchi, 2009)

- a) La fibra insoluble. Este tipo de fibra se encuentra en alimentos como el salvado de trigo, granos enteros y las verduras. Su principal acción en el organismo es aumentar el volumen de las heces, disminuyendo el tiempo de tránsito de los alimentos y las heces a través del tubo digestivo, así como acelerar el proceso de peristaltismo. Como consecuencia, este tipo de fibra, al ingerirse diariamente en la dieta, facilita las deposiciones ayudando a eliminar el estreñimiento. (Marsilio, 2000)
- b) La fibra soluble, se disuelve en agua y alcohol. Se encuentra en leguminosas, la avena, la cebada y algunas frutas. Las dietas altas en fibra soluble y bajas en grasa disminuyen los niveles de colesterol sanguíneo. Además este tipo de fibra y los componentes que contiene puede regular la absorción intestinal de los azúcares procedentes de los alimentos. (Marsilio, 2000)

Los especialistas en nutrición cifran los requerimientos de fibra dietética en aproximadamente 20-25 g/día. Estos agentes, al disminuir los niveles de colesterol en sangre, disminuyen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. También reduce el riesgo de padecer cáncer de colon, probablemente debido a su acción de arrastre de xenobióticos carcinogénicos. (Marlett, 2000)

La fibra dietética es un conjunto heterogéneo de moléculas complejas con características y efectos fisiológicos y metabólicos benéficos y específicos en el organismo. A continuación se mencionan los grupos más comunes de la fibra: (Marlett, 2000)

1. Celulosa: Es la parte insoluble de la fibra dietética, abundante en harina de trigo entera, salvado, y verduras como alcachofas, espinacas y judías verdes. La celulosa forma parte de las paredes celulares vegetales. (Miranda, 2010)
2. Hemicelulosa: Es una mezcla de glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, manosa, y ácidos urónicos, formando parte de la fibra insoluble que se encuentra en salvado y granos enteros de diferentes cereales. (Miranda, 2010)
3. Sustancias pécticas: Son sustancias orgánicas con alto contenido en galacturónico sobre todo se encuentran en cítricos y manzanas, también en el salvado, cebada y legumbres. (Miranda, 2010)
4. Hidratos de carbono resistentes: Son aquellos polímeros de hidratos de carbono que resisten la digestión enzimática en el tracto gastrointestinal y son metabolizados por la flora intestinal en el intestino grueso. Se caracterizan por ser extensas cadenas de glucosa y están contenidos principalmente en tubérculos como la papa y el camote. (Van Laere, 2010)
5. Compuestos no carbohidratos: como la lignina que posee gran cantidad de ácidos y alcoholes fenilpropiónicos formando la fibra insoluble con gran capacidad de unirse y arrastrar otras sustancias por el tubo digestivo. (Sherianne, 1998)
6. Las gomas y los mucílagos: están formadas por ácido urónico, xilosa, arabinosa o manosa, como la goma guar, arábica, y tragacanto. Son polisacáridos no estructurales que secretan las plantas frente a las lesiones. La composición depende del grado de

maduración de la planta. A más maduración más celulosa y lignina y menos mucílagos y gomas. (Trabs, 2009)

Existen otras sustancias que forman parte y están ligados a los componentes de la fibra dietética tales como la cutina, taninos, suberina, ácido fítico, proteínas, iones como calcio, potasio y magnesio con efectos que complementan las funciones gastrointestinales que efectúan las macromoléculas. (Quintín Olascoaga, 2003)

La fibra dietética es el componente de alimentos exclusivamente de origen vegetal que no puede ser digerida por el organismo debido a que el aparato digestivo humano no cuenta con las enzimas necesarias que pueden digerirla, degradarla y utilizarla como fuente de energía por lo que se considera carente de valor nutricional. La fibra dietética alimentaria se localiza principalmente en los restos de las paredes de células vegetales. (Bowling, 2006)

La inclusión de frutas frescas, verduras y derivados de cereales junto con las legumbres a la dieta, aporta dosis considerables y suficientes de fibra alimentaria en la alimentación (Park, 2007). La mezcla de nutrientes y de diferentes componentes y elementos presentes en los alimentos es mucho más beneficiosa que solo la fibra pura de los suplementos debido a que dicha combinación proporciona un efecto sinérgico de los efectos fisiológicos y gastrointestinales. Lo idóneo es acostumbrar al tracto intestinal a la ingestión de la fibra dietética y beber cantidades considerables de agua para que sea posible facilitar el tránsito alimenticio. (Majem, 2006)

2.2 Inulina

La inulina es un polisacárido que se encuentra de manera natural en las fuentes vegetales, forma parte de la fibra soluble. Sus subproductos del metabolismo realizado por dicha

microbiota son los que tienen efecto fisiológico en el organismo debido a que aumentan el peristaltismo intestinal y facilitan la absorción de algunos elementos minerales como calcio, magnesio y fósforo. (Ronkart, 2007)

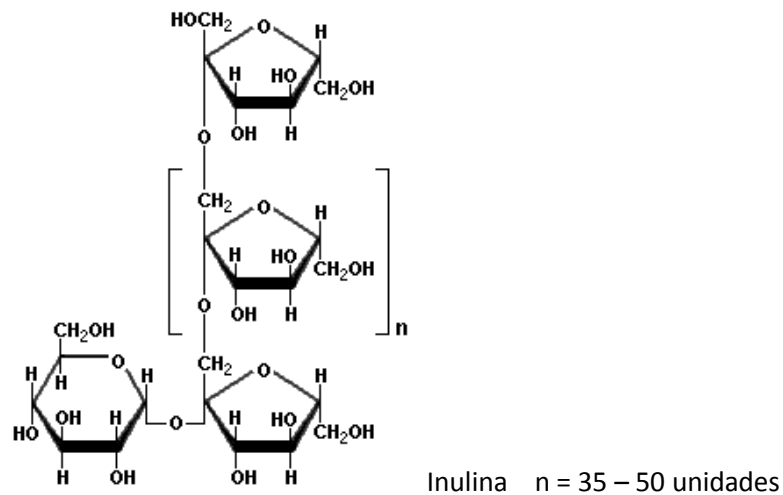


Figura 1. Estructura química de Inulina

Fuente: Gibbons, 2002, Journal of Molecular Biology

En 1990 FDA (Food and Drug Administration) y en 1992 Codex Alimentarius, respectivamente, definieron a la fibra dietética como el material que precipita en solución de etanol, de acuerdo con los métodos clásicos de análisis. Pero estos métodos no cuantifican aquellos compuestos que cumplen con las definiciones más recientes de fibra dietética, ya que éstos no precipitan en medio acuoso de etanol. La inulina y sus derivados son algunos de esos compuestos, como son moléculas relativamente pequeñas (peso molecular aproximado de 6.000), en comparación con otros compuestos convencionalmente aceptados como fibra dietética (peso molecular entre 10.000 – 50.000), no precipitan completamente en solución de etanol, pues son solubles o parcialmente solubles en dicho solvente. A diferencia de la inulina, los fructooligosacáridos son oligosacáridos derivados lineales formados por 10-20 monómeros de fructosa, unidos por enlaces β (1 \rightarrow 2) y que contienen una molécula inicial de glucosa. (Madrigal y Sangronis, 2007).

Los hidratos de carbono, en especial la inulina y sus derivados, se están utilizando de manera creciente en el procesado de alimentos, debido a sus características funcionales y nutritivas, en especial, a sus propiedades como ingrediente prebiótico y funcional. Características que van desde un sabor moderadamente dulce, hasta los más complejos que pueden servir como sucedáneos de harinas, pasando por atributos de gran complejidad sin sabor y con una textura y palatabilidad muy similar a la de las grasas. Además de estas propiedades, es interesante destacar que el aporte energético de la inulina es tan solo de 1,5 Kcal /g. Por todo ello, en numerosos productos, en especial lácteos y helados, la inulina se usa para reemplazar a las grasas. (Markwart, 1994)

Existen fuentes naturales que contienen inulina, entre ellas se encuentran plantas que se usan como alimentos. La **Tabla 1** presenta de manera decreciente el contenido de las principales fuentes vegetales; es importante mencionar que las primeras tres fuentes son plantas no comestibles.

Tabla 1. Principales fuentes que contienen inulina y su contenido en base seca

Fuente	Inulina (%)
Agave (<i>Agave spp</i>)	16-25
Diente de León (<i>Taraxacum officinalis</i>)	12-15
Papa de Jerusalén (<i>Helianthus tuberosus</i>)	14-19
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	10-15
Ajo común (<i>Allium sativum</i>)	9-16
Yacón (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	3-19
Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	3-10
Puerro (<i>Allium porrum</i>)	3-10
Cebolla Morada (<i>Allium cepa</i>)	2-6
Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i>)	2-3

Fuente: Fisher Rosemary, 1999, Journal of Nutrition

El consumo de fuentes de fibra alimenticia resulta benéfico porque diferentes tipos de fibra proporcionan beneficios específicos y actúan de distinta manera en el organismo.

La producción a nivel industrial la inulina y sus derivados y fructooligosacáridos se obtiene exclusivamente de la raíz de la achicoria. También se pueden emplear fuentes naturales como la cebolla, el ajo o el puerro entre otros; que resultan, en otras propiedades, muy beneficiosos para la salud. Estas fuentes, además de tener las propiedades clásicas de las fibras alimentarias para regular el tránsito intestinal, contribuyen a la estimulación de las defensas naturales de la flora intestinal (efecto bífidos), así como ayudar a reducir los niveles de colesterol y los índices de azúcar en el tracto sanguíneo. (Van Laere, 2002).

El buen funcionamiento del sistema digestivo es clave en la absorción de las sustancias benéficas y nutrientes de los alimentos, lo que repercute en la salud y el bienestar general del organismo. (Roberts, 2004)

Se han desarrollado métodos de extracción de inulina a nivel laboratorio para su cuantificación en fuentes naturales. Sin embargo, son pocos los métodos analíticos para llevar a cabo una extracción de inulina a nivel industrial. (Roberts, 2004)

2.3 Métodos de Extracción

La Asociación Oficial de Químicos Analíticos de Estados Unidos (AOAC, por sus siglas en ingles) publica métodos para la extracción cuantitativa de inulina proponiendo un método, empleando un equipo de cromatografía de intercambio iónico (1996) o un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (1996). Posteriormente se propone un método enzimático-espectrofotométrico (1997) caracterizándose por ser un método enzimático-colorimétrico. Hoy en día se recomienda determinar el contenido de fibra dietética y de inulina por medio de métodos oficiales y disponibles. (AOAC, 997.03 y 999.03)

Existe un método en particular (AOAC 998.07) este es un método general y óptimo a nivel laboratorio de extracción de inulina que se caracteriza porque cuantifica el contenido de inulina, derivados de inulina (fructanos) y glucosa. Este método se basa en 3 pasos:

1. Extracción

1.1 Se realiza con agua hirviendo a pH= 6.6 – 8.0.

1.2 La solución se mantiene en agitación a T= 80 °C durante t= 10 min.

2. Hidrólisis por Acción Enzimática

Se emplea la enzima amiloglucosidasa a T= 60 °C y t= 30 min bajo agitación.

3. Determinación de Azúcares por Cromatografía

AOAC 997.08 específica que debe emplearse un equipo de HPLC. (AOAC, 9980.07 y 997.08)

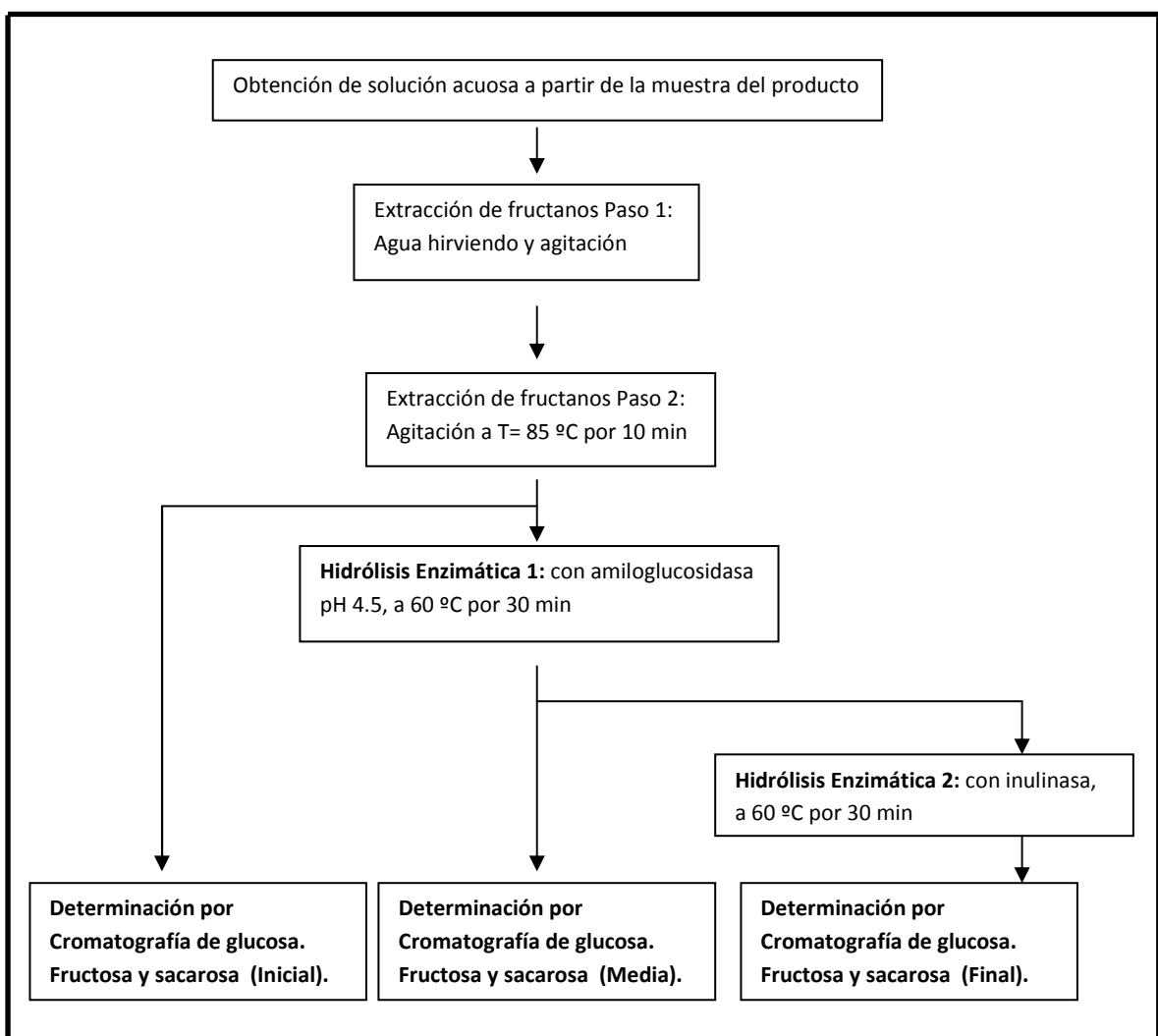


Figura 2. Método de Determinación de Fructanos

Fuente: AOAC, 9980.07 y 997.08

Existe un método de inulina cuantitativo general a nivel industrial para la planta de achicoria basándose en una extracción de agua caliente, posteriormente se hace una

purificación y un secado para la obtención de un concentrado rico en inulina. En la **Figura 2** se presenta el diagrama de trabajo del proceso de extracción de inulina y sus derivados. (Madrigal y Sangronis, 2007).

Algunos de otros métodos que se reportan comprenden etapas de filtración y ultrafiltración, precipitación con diferentes disolventes orgánicos y secado. Lo que tienen en común dichos métodos es la solubilidad y aislamiento de la inulina de la matriz alimenticia.

En la **Figura 3** se presenta de manera grafica el proceso de extracción de inulina y sus derivados a partir de fuentes naturales a nivel industrial. Dicho método es el procedimiento actual mas empleado. (Madrigal y Sangronis, 2007).

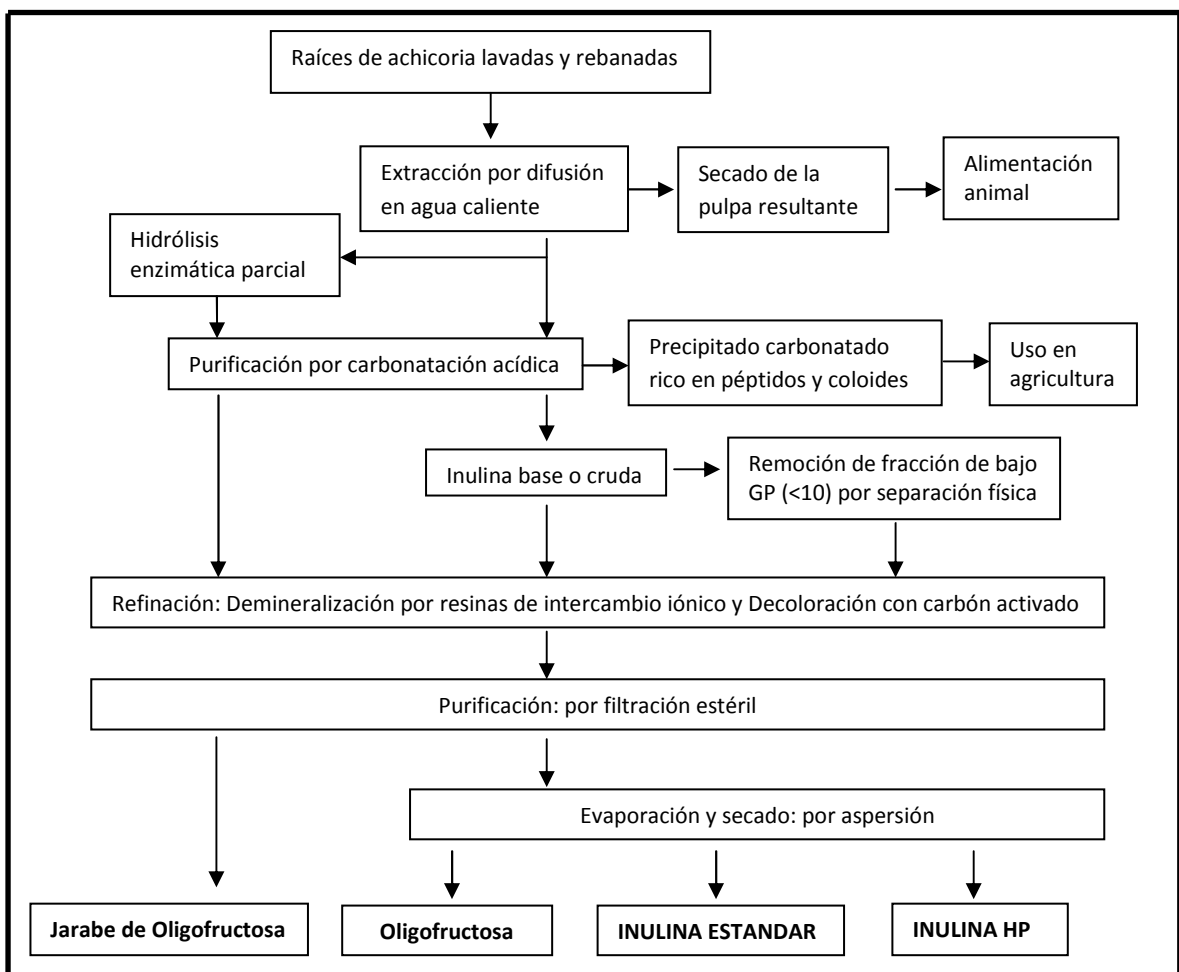


Figura 3. Procesos de Obtención Industrial de Inulina
Fuente: Madrigal y Sangronis, 2007

Respecto a la extracción cuantitativa de inulina se proponen cuatro métodos diferentes, que a continuación se explican brevemente:

Método #1 – Ultrafiltración

La ultrafiltración, conocida comúnmente como UF, es un método de separación física empleando una membrana con determinado tamaño de poro que consiste en la aplicación de presión por medio de un gas impulsando a los sólidos en suspensión para producir una solución de alta pureza y baja densidad de sedimento. Cabe mencionar que el proceso de filtración con membranas se ha convertido rápidamente en la opción preferida para el tratamiento de soluciones acuosas. Los desarrollos recientes en los tipos y configuraciones han incrementado la viabilidad económica y técnica en aplicaciones de grandes volúmenes. (Arnal, 2008)

Método #2 – Sistema de Filtraciones con Celita

El sistema de filtración provee una barrera física entre el alimento y la solución producto. La calidad del filtrado de la membrana es directamente proporcional al tamaño de poro. Dado que el proceso de separación está basado en el tamaño, considerables variaciones en el alimento tales como turbidez o tamaño de partículas, afectan en la calidad de la solución final.

La celita, o también conocida como tierra de diatomeas, es un coadyuvante de filtración que consiste en sílice finamente pulverizada. Tiene una gran superficie y puede ser de mucha utilidad en ciertas operaciones de la filtración. Son agentes filtrantes que se utilizan para retener sobre la superficie del filtro partículas provocando efectos deseados en el filtrado. En algunos casos, la tierra de diatomeas va acompañada de fibras de celulosa para

incrementar la efectividad del sistema y la calidad de la solución filtrada. (Osmanlioglu, 2006)

Método #3 – Filtración Agua 80% / EtOH 20%

Con el mismo principio de un sistema de filtraciones, se genera una barrera física para la remoción de los sólidos de diferentes tamaños y obtener una solución concentrada en inulina y fructooligosacáridos. La característica de este método radica en tener un medio de solución acuoso/alcohólico (Agua 80%/ Etanol 20%); ya que la fibra dietética está conformada por una parte soluble y una fracción insoluble, la función del etanol es modificar la constante dieléctrica del medio y, por lo tanto, disminuir la solubilidad de la fracción insoluble y hidratos de carbono no celulósicos favoreciendo la extracción mayoritaria y exclusiva de inulina y fructooligosacáridos.

Método #4 – Proceso de Extracción con Secado como Operación Unitaria

El proceso de secado no se considera estrictamente un método de extracción. El secado es una operación unitaria que consiste en separar cantidades de agua u otro disolvente de un material sólido con el fin de reducir el contenido de líquido residual hasta un valor aceptablemente bajo. El secado es habitualmente la etapa final de una serie operaciones unitarias.

El secado por bandejas o secado en estufa convencional es el tipo de secado más común que consiste en un gabinete de tamaño suficientemente grande para alojar los materiales a secar, en el cual se hace correr suficiente cantidad de aire caliente y seco con ayuda de un ventilador para dispersar el gas y hacer que el secado sea más efectivo. (Park, 2007)

2.4 Características Generales de la Cebolla

Cebolla es el nombre común que se le asigna al género de hierbas bianuales de la familia *Liliaceas* y del genero *Allium*, cultivada en regiones templadas y subtropicales desde hace miles de años. La cebolla es una planta bulbosa con hojas cilíndricas largas, huecas y engrosadas en la base que constituyen la mayor parte del bulbo. Las flores, blancas o rosadas y dispuestas en umbelas, tienen seis sépalos, seis pétalos, seis estambres y un solo pistilo (Ramirez, 2006). Los frutos son pequeñas cápsulas llenas de semillas muy pequeñas. Ciertas variedades forman en lugar de flores unos bulbillos que pueden enterrarse para obtener nuevas plantas. La planta de la cebolla contiene esencias volátiles sulfurosas que le confieren el sabor pungente característico y la sensación de ardor en los ojos; uno de los componentes de estas esencias se disuelven con rapidez en agua y produce ácido sulfúrico; éste puede formarse en la película lacrimal que recubre el ojo, y por eso produce lagrimeo al cortar la cebolla. (Schneeman, 1990)

Las cebollas se obtienen con facilidad a partir de semillas, que se siembran directamente en el terreno o en semillero para obtener bulbos pequeños. La cebolla es tolerante en cuanto a temperatura, y puede plantarse a lo largo de todo el año si el suelo se mantiene rico y húmedo. Se siembra entre cuatro y seis semanas antes de las últimas heladas de primavera o se planta a finales del verano para cosechar en otoño. (Schneeman, 1990)

La producción mundial de cebolla morada en el 2007 superó los 60 millones de toneladas (Fuente: FAO), con una tendencia a aumentar para los próximos años. México contribuye con una producción menor al 2%.

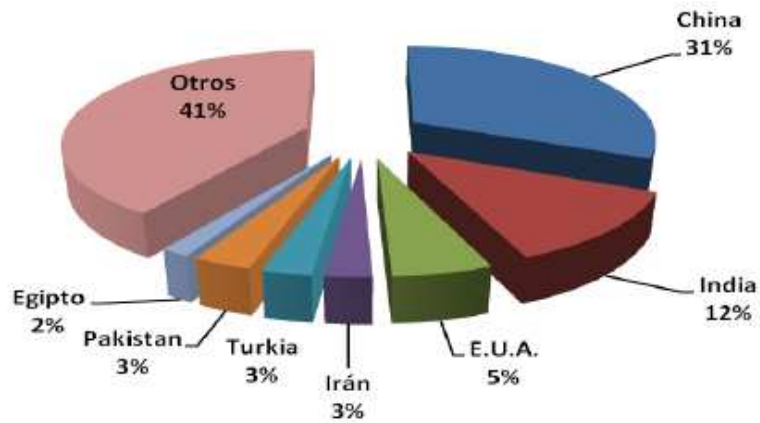


Figura 4. Participación Mundial de Producción de Cebolla Morada
Fuente: FAO, 2007

En México, la cebolla morada se encuentra entre las cinco hortalizas más importantes en cuanto a la superficie sembrada; en el 2007, la superficie destinada al cultivo de cebolla era de 48,703 hectáreas (Fundación Produce Chihuahua A. C.) y el 95% de la producción es de riego. Para el 2007 se obtuvo un volumen de 1.38 millones de toneladas y para el 2008 se estimo una producción de 1.35 millones de toneladas.

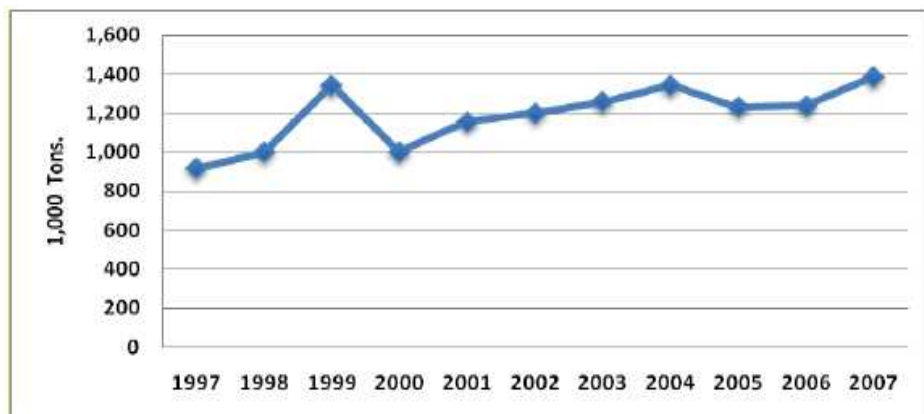


Figura 5. Dinámica de la Cadena Agro-Alimentaria de Cebolla Morada en el Estado de Chihuahua

Fuente: Fundación Produce Chihuahua, 2007

Ya que México se encuentra dentro de los mejores productores de cebolla morada, se pretende emplear este tubérculo como fuente natural principal para la extracción potencial de inulina. (Selvendran, 1995)

2.5 Valor Nutricional de la Cebolla Morada

Se trata de un alimento con alto porcentaje de agua, a lo que se atribuye su bajo contenido en lípidos y, por consecuencia, su bajo valor energético. Respecto a las sales minerales, es una fuente rica en potasio, calcio, fósforo, magnesio y sodio. Tiene un mínimo contenido de proteína del cual sobresale el ácido glutámico. Cabe destacar que la cebolla morada contiene micronutrientes de los cuales los más importantes son la riboflavina (Vitamina B2) y tiamina (Vitamina B1). (Marian, 2008).

En la siguiente **Tabla 2** se muestra el contenido de nutrientes en 100 gramos de bulbo crudo:

Tabla 2. Análisis Bromatológico de la Cebolla Morada

NUTRIENTES		CONTENIDO POR 100 g DE MUESTRA	
Agua	86 g	Sodio	7 mg
Glúcidos	10 g	Hierro	0.50 mg
Proteínas	1.4 g	Nicotinamida	0.50 mg
Lípidos	0.2 g	Manganeso	0.25 mg
Celulosa	0.8 g	Ácido pantoténico	0.20 mg
Potasio	180 mg	Cobre	0.10 mg
Azufre	70 mg	Zinc	0.08 mg
Fósforo	44 mg	Riboflavina	0.07 mg
Calcio	32 mg	Tiamina	0.05 mg
Ácido ascórbico	28 mg	Carotenoides	0.03 mg
Cloro	25 mg	Yodo	0.02 mg
Magnesio	16 mg	Energía	25 – 30 Kcal

Fuente: FAO, 2000

3. OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Establecer un método de extracción de inulina de bajo costo y viable como propuesta a nivel laboratorio proveniente de cebolla morada.

Objetivo Específico

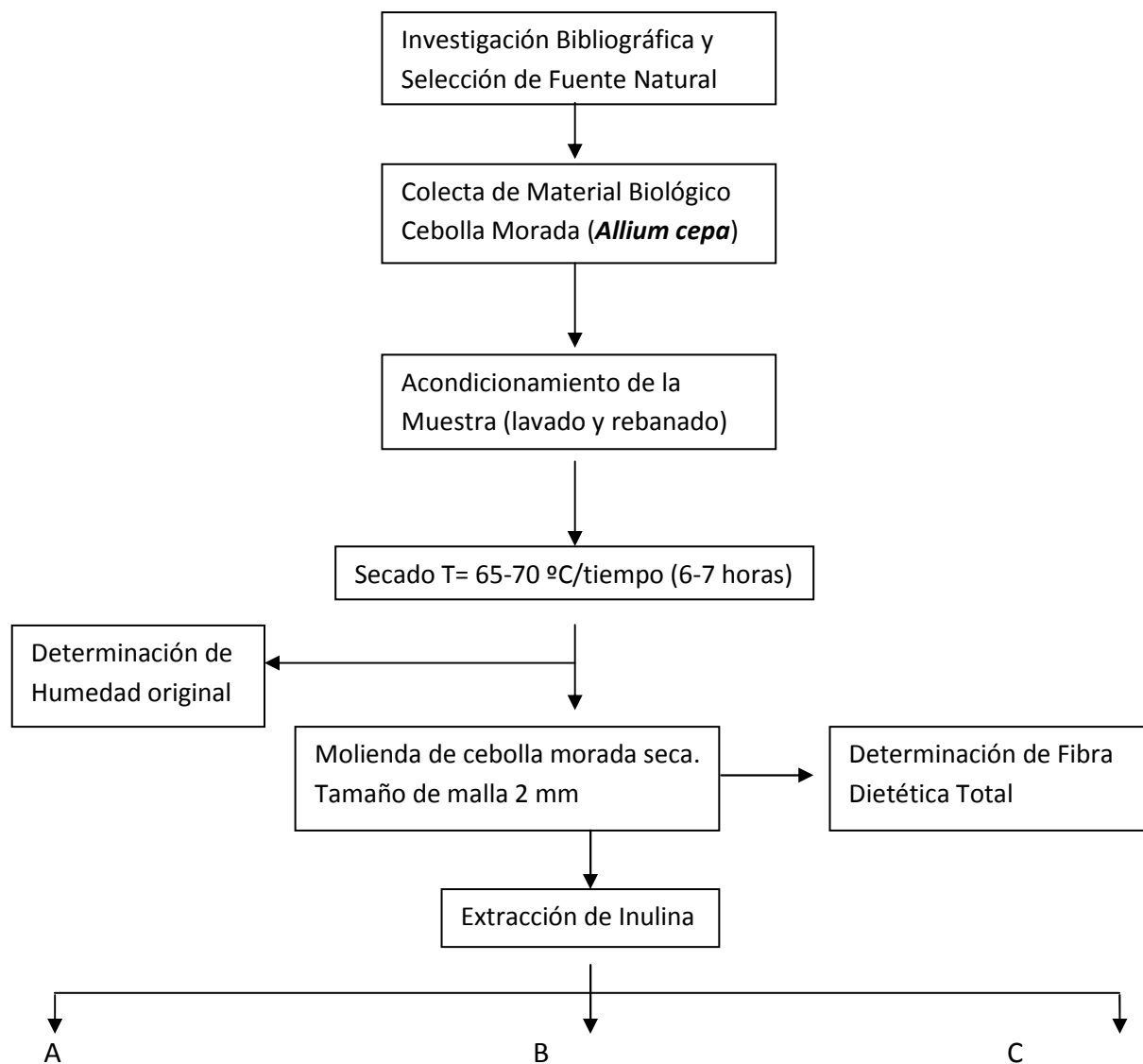
- ✓ Cuantificar y evaluar el contenido inulina presente en diferentes lotes de cebolla morada (*Allium cepa*) obtenidas de diferentes fuentes geográficas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR).
- ✓ Establecer si existe diferencia en el contenido de inulina en función de la procedencia de la cebolla morada.
- ✓ Evaluar diferentes métodos de extracción de inulina reportados en la literatura de acuerdo a condiciones de extracción y porcentaje de recobro o eficiencia.

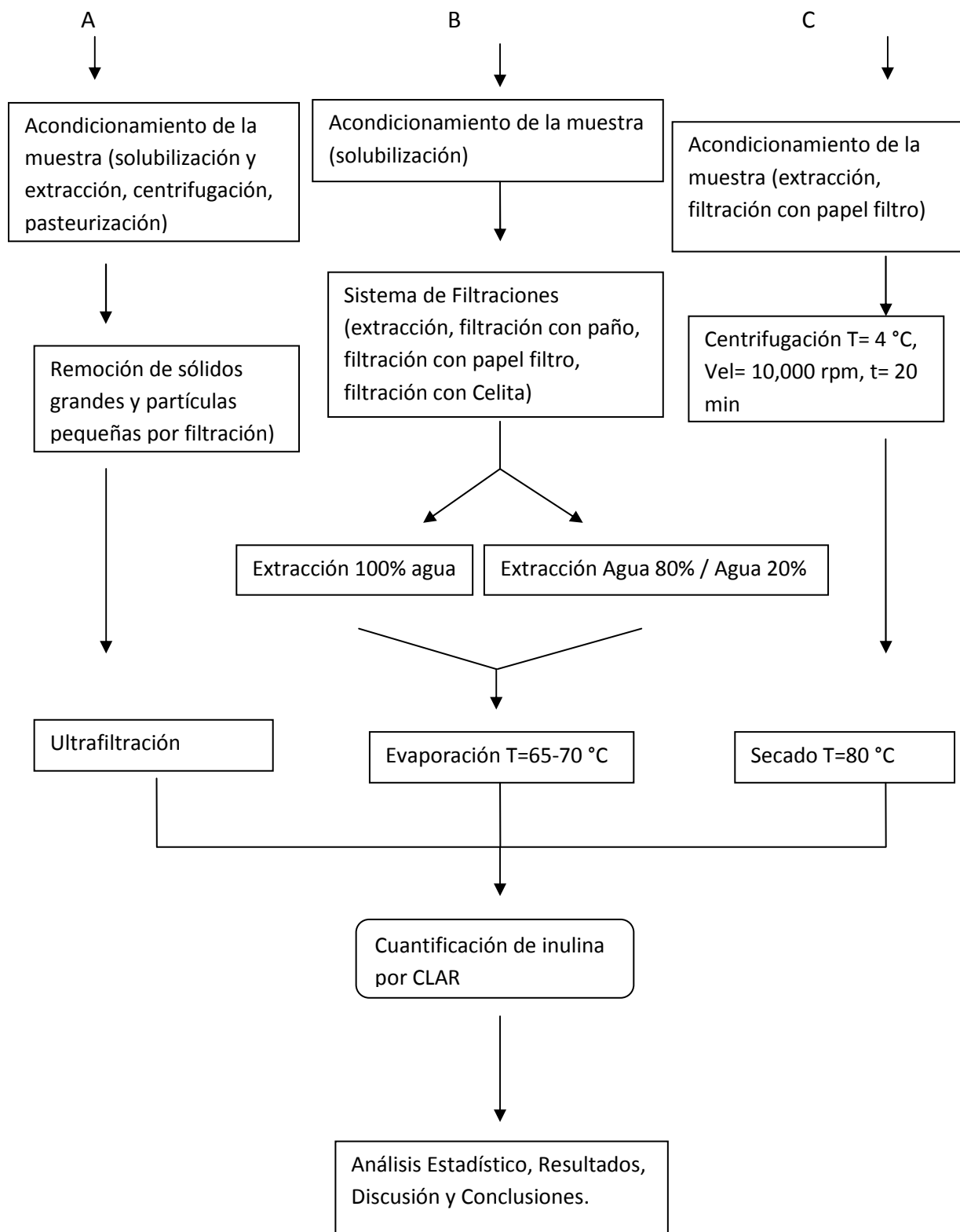
4. Metodología

El proyecto consta de una previa selección y colecta de material biológico (Cebolla Morada [*Allium cepa*]) en diferentes regiones geográficas.

El material biológico se somete a un acondicionamiento para facilitar y favorecer el secado y rebanado del mismo. Posteriormente se lleva a cabo la extracción y cuantificación de inulina, así como la determinación de Fibra Dietética.

Diagrama 1. Diagrama general de investigación





4.1 Muestras

La material biológico estudiado fue cebolla morada comestible (*Allium cepa*) que fue recolectada de diferentes puntos de venta como mercados, tianguis, supermercados, centrales de abasto localizados en diferentes puntos del Distrito Federal y Área Metropolitana.

Tabla 3. Número de Replicas y procedencia de adquisición de los diferentes lotes analizados

LOTE	PROCEDENCIA
1	El lote fue comprado en Tienda UNAM, dicho establecimiento es surtido por la Central de Abastos con sucursal en La Viga. La mayor parte de la cebolla morada es cultivada en Puebla y Tlaxcala.
2	Este lote fue comprado en la Central de Abastos de Texcoco. Los comerciantes tiene contacto directo de compra/venta con agricultores del sur del Estado de México.
3	Los cultivos de cebolla morada se localizan en Texas. Por medio del consorcio Walt Mart, son importados y distribuidos en cada sucursal, incluyendo Superama.
4	El lote fue adquirido en un tianguis que se pone todos los domingos en la colonia Valle Ceylán del municipio de Tlalnepantla, Estado de México.
5	El lote fue comprado en un tianguis que se pone todos los sábados en la colonia Parque Residencial Coacalco, municipio de Coacalco, Estado de México.



Figura 5. Cebolla morada (*Allium cepa*)

4.2 Acondicionamiento

Debido a que la cebolla morada es un producto vegetal con un contenido de humedad que va de 86-90%, se sometió a un proceso de secado en estufa convencional con aireación de acuerdo al método propuesto por la AOAC (925.10).

4.2.1 Materiales y Reactivos

- a) Estufa con temperatura controlada y aeración Lab-line Imperial 3.
- b) Balanza analítica y/o granataria.
- c) Molino de acero inoxidable Thomas-Whiley Modelo 4.

4.2.2 Procedimiento

- ✓ Se coloca la muestra en la estufa a temperatura controlada (55-60 °C).
- ✓ Las muestras secas se muelen en un molino de acero inoxidable Thomas-WILEY Modelo 4; la harina obtenida se homogeneiza por medio de una malla de 2 mm y se almacenan en recipiente de plástico en un lugar seco y fresco.

4.3 Determinación de Fibra Dietética Total (AOAC, 16^a. Ed⁴).

El fundamento de este ensayo parte de medir el contenido de fibra dietética de los alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. La determinación de la fibra dietética se lleva a cabo tratando muestras secas y desengrasadas. Primeramente, la muestra se trata con α -amilasa (termoestable) para hidrolizar el almidón e hidratos de carbono amiláceos, posteriormente se digieren enzimáticamente con proteasa y

amiloglucosidasa para eliminar la proteína y almidón presente en la muestra. La fibra dietética insoluble se precipita con etanol y etanol/acetona. Después se secan los residuos, se pesan y se determina el contenido de proteína y cenizas.

4.3.1 Materiales y Reactivos

- a) Crisol Gooch: Porosidad #2 (porosidad= 40-60 μm)
- b) Fuente de vacío con trampa para prevenir contaminación.
- c) Horno a 105 °C u horno de vacío a 70 °C
- d) Desecador
- e) Mufla
- f) Baño de agua hirviendo (90-92 °C) y baño de agua a 60 °C con agitación
- g) Vasos de precipitados de 100 mL
- h) Balanza analítica sensibilidad 0.01 g
- i) Potenciómetro calibrado con buffer estándar de pH=4 y pH=7
- j) Micropipetas
- k) Termómetro (-10 °C a 100 °C)
- l) Kit Total Dietary Assay (SIGMA TDF-100A). Conservar en refrigeración
 - α -amilasa, estable al calor (10 mL); (SIGMA A 3306)
 - Proteasa de *Bacillus licheniformis* (500 mg); (SIGMA P 3910)
 - Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (10 mL); (SIGMA A 9913)

Preparación de Reactivos

- Amortiguador de fosfatos, 0.08 M, pH=6. Se disolvieron 1.4 g Na_2HPO_4 anhidro, y 8.4 g NaH_2PO_4 anhidro en aproximadamente 700 mL de agua destilada. Se diluyó sin llevar al aforo con agua. Se verificó el pH y se ajustó con NaOH, se aforó a un litro y se mezcló.

- Etanol 78%. Medir 207 mL de agua en un matraz volumétrico de 1L y aforar con etanol a 95%. Mezclar
- Solución de NaOH, 0.275 N. Se diluyeron 275 mL de solución de NaOH 1.0 N y se llevo a un aforo de 1 litro en un matraz volumétrico. Se guardo en frasco bien tapado a temperatura ambiente.
- Solución de HCl, 0.325 N. se diluyeron 325 mL de solución de HCl 1.0 N y se llevo a un aforo de 1 litro en un matraz volumétrico. Se guardo en frasco tapado a temperatura ambiente.

4.3.2 Procedimiento

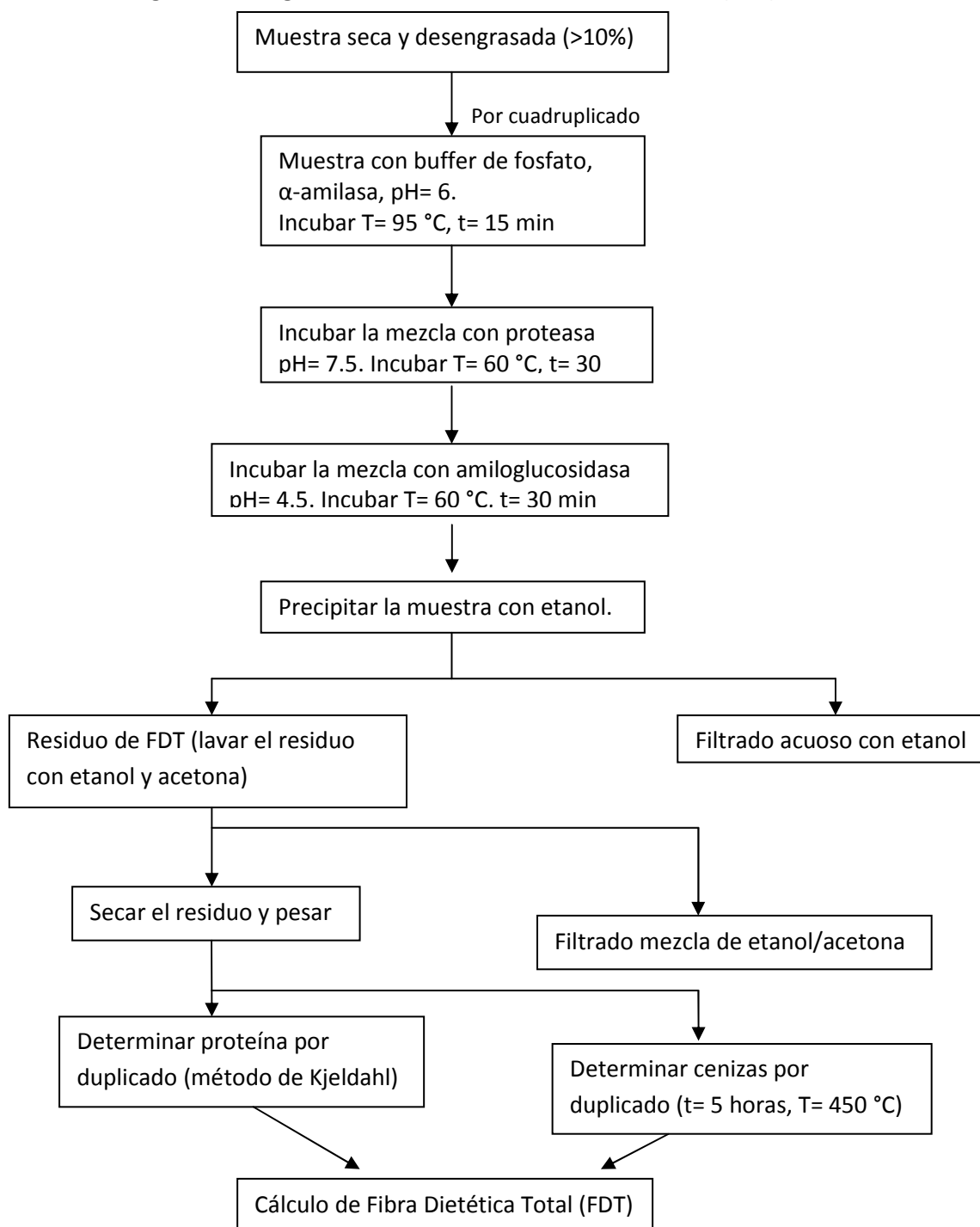
- ✓ Realizar la determinación por cuadruplicado para la muestra y un blanco (para tener duplicados para realizar la determinación de proteína y cenizas).
- ✓ Preparación de crisoles. Lavar los crisoles Gooch, secarlos, calentarlos a 405 °C y posteriormente enfriarlos. Agregar 0.5 g de Celita a cada crisol y secar a T= 130 °C hasta peso constante. Registra peso como "Celita + crisol" (P1).
- ✓ Preparación de la muestra. Si el contenido de grasa de la muestra es mayor al 10%, desengrasar con éter de petróleo. Homogeneizar la muestra y, si es necesario, moler con una malla de 0.3-0.5 mm.
- ✓ Determinación de la fibra dietética. Pesar 4 muestras y 4 blancos de 0.5 g de cada material por analizar y colocar en vaso de precipitados. Registrar los pesos.
- ✓ Hidrólisis enzimática.
 - Agregar a cada vaso 25 mL de buffer de fosfatos pH= 6.0.
 - Agregar a cada vaso 0.05 mL de α -amilasa termoestable (SIGMA A 3306) y agitar bien. Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocarlo en un baño de

agua hirviendo (90-92 °C) con agitación cada 5 minutos durante 15 minutos de incubación.

- Dejar enfriar las soluciones y ajustar $\text{pH}=7.5\pm 0.2$ agregando 0.5 mL NaOH 0.275 N a cada vaso.
 - Agregar 0.1 mL de proteasa (SIGMA P 3910) de concentración 25 mg/mL a de cada vaso.
 - Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocarlo en baño de agua a 60 °C con agitación continua, incubar durante 30 minutos a partir de que la solución alcance los 60 °C.
 - Se enfrían las soluciones a temperatura ambiente. Ajustar $\text{pH}=4.0-4.6$ agregando 5 mL de HCl 0.325 mL a cada vaso.
 - Agregar 0.05 mL de amiloglucosidasa (SIGMA A 9913) a cada vaso. Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocarlo en un baño de agua a 60 °C con agitación. Incubar por 30 minutos después de que la solución llegue a 60 °C.
 - Agregar 125 mL de etanol 95% y dejar reposar toda la noche a $T = T_{\text{amb}}$ para sedimentar la fibra dietética soluble
- ✓ Filtración. Montar un sistema de filtración para cada crisol Gooch. Humedecer y redistribuir la Celita. Aplicar succión suave.
 - ✓ Lavar el residuo con 3 porciones de 10 mL de etanol 78%, 2 porciones de 5 mL de etanol 95% y 2 porciones de 5 mL de acetona.
 - ✓ Secar los crisoles que contienen los residuos durante toda la noche en estufa.
 - ✓ Enfriar los crisoles en un desecador y registrar los pesos como “residuo + Celita + crisol” (P2).

- ✓ Determinación de cenizas. Calcinar a $T= 450\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 horas hasta peso constante. Enfriar en el desecador y pesar registrando como “cenizas + Celita + crisol” (P3).
- ✓ Determinación de proteína. Determinar el contenido de proteína por el método de Kjeldahl (AOAC 1995). Usar el factor de 6.25 para convertir el nitrógeno.

Diagrama 2. Diagrama de Análisis de Fibra Dietética Total (FDT)



4.3.3 Calculo de Fibra Dietética Total

Para calcular el % de Fibra Dietética Total se requiere el dato de masa del residuo posterior al tratamiento enzimático, la cantidad de muestra, cenizas y proteína del mismo residuo. A los siguientes datos se le restaron su respectivo blanco.

Tabla 4. Datos requeridos para el cálculo de FDT

	Masa Promedio (g)
Muestra	0.5072
Residuo	0.1117
Cenizas	0.02445
Proteína	9.0550E ⁻⁴

Se emplea la siguiente ecuación

$$\% \text{ Fibra Dietética Total} = \frac{(R - P - C) \times 100}{M}$$

Donde:

R – Masa de residuo de la muestra (g)

P – Masa de proteína (g)

C – Masa de cenizas (g)

M – Masa de muestra total (g)

Sustituyendo:

$$\% \text{ Fibra Dietética Total} = \frac{(0.1117 - 9.05507E^{-4} - 0.02445) \times 100}{0.5072}$$

$$\% \text{ Fibra Dietética Total} = 17.02 \%$$

4.4 Extracción de Inulina

Debido a que la inulina se encuentra ligada a otras macromoléculas y componentes dentro de una matriz compleja de nutrientes, es necesario someter la muestra a un tratamiento enzimático con el cual se dispone y aísla la inulina y otros fructooligosacáridos. Posteriormente, la cuantificación se realiza en un equipo de CLAR empleando una columna de exclusión molecular. A partir de los cromatogramas se obtienen las áreas que corresponden a cada hidrato de carbono cuantificado y por correlación con una curva patrón se conocerá la concentración de inulina en cada uno de los lotes.

Se toma una muestra de la fibra soluble para su extracción y purificación. La extracción se lleva a cabo con una digestión enzimática con α -amilasa, después con proteasa y amiloglucosidasa. Por medio de una filtración con una membrana de Nylon se realiza la purificación obteniéndose una solución donde se determina el contenido de inulina y fructoolisacáridos empleando un equipo de HPLC.

4.4.1. Materiales y reactivos

- a) Vasos de precipitados 100 mL
- b) Fuente de vacío con trampa
- c) Incubadora 35-100 °C
- d) Parrilla de agitación CIMAREC Modelo Sp131635
- e) Kit Total Dietary Assay (SIGMA TDF-100A). Conservar en refrigeración
 - α -amilasa, estable al calor (10 mL); (SIGMA A 3306)
 - Proteasa de *Bacillus licheniformis* (500 mg); (SIGMA P 3910)
 - Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (10 mL); (SIGMA A 9913)

Preparación de Reactivos

- ✓ Amortiguador de fosfatos, 0.08 M, pH=6. Se disolvieron 1.4 g Na_2HPO_4 anhidro, y 8.4 g NaH_2PO_4 anhidro en aproximadamente 700 mL de agua destilada. Se diluyó sin llevar al aforo con agua. Se verificó el pH y se ajustó con NaOH, se aforó a un litro y se mezcló.
- ✓ Solución de NaOH, 0.275 N. Se diluyeron 275 mL de solución de NaOH 1.0 N y se llevo a un aforo de 1 litro en un matraz volumétrico. Se guardo en frasco bien tapado a temperatura ambiente.

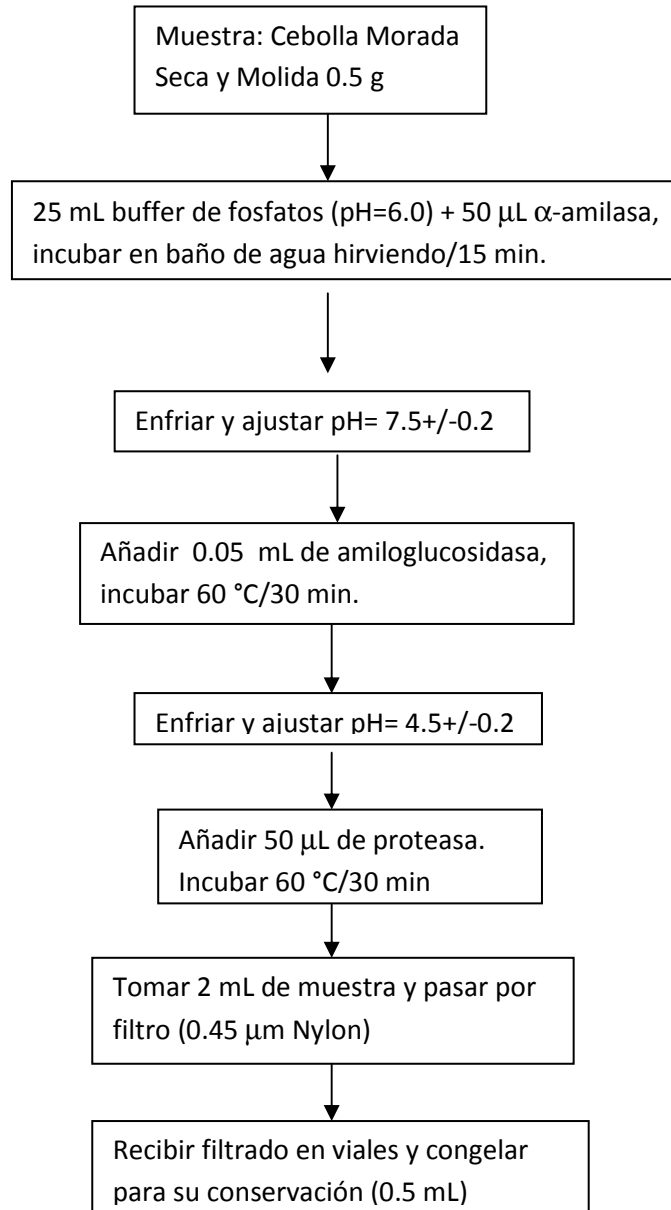
- ✓ Solución de HCl, 0.325 N. se diluyeron 325 mL de solución de HCl 1.0 N a y se llevo a un aforo de 1 litro en un matraz volumétrico. Se guardo en frasco tapado a temperatura ambiente.

4.4.2 Procedimiento

- Hidrólisis enzimática
- ✓ Se pesa por triplicado 0.5 g de cada muestra a analizar y se coloca en vasos de precipitados de 100 mL. Anotar el peso.
- ✓ Agregar a cada vaso 25 mL de amortiguador de fosfatos pH=6.0.
- ✓ Agregar a cada vaso 0.05 mL de α -amilasa termoestable (SIGMA A 3306) y agitar bien. Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocarlo en un baño de agua hirviendo (90-92 °C) con agitación cada 5 minutos durante 15 minutos de incubación.
- ✓ Dejar enfriar las soluciones y ajustar pH=7.5+/-0.2 agregando 0.5 mL NaOH 0.275 N a cada vaso.
- ✓ Agregar 0.1 mL de proteasa (SIGMA P 3910) de concentración 25 mg/mL a de cada vaso.
- ✓ Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocarlo en baño de agua a 60 °C con agitación continua, incubar durante 30 minutos a partir de que la solución alcance los 60 °C.
- ✓ Se enfrían las soluciones a temperatura ambiente. Ajustar pH=4.0-4.6 agregando 5 mL de HCl 0.325 mL a cada vaso.
- ✓ Agregar 0.05 mL de amiloglucosidasa (SIGMA A 9913) a cada vaso. Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocarlo en un baño de agua a 60 °C con agitación. Incubar por 30 minutos después de que la solución llegue a 60 °C.
- Filtración

- ✓ Extraer alícuota de 1-2 mL de solución de fructoligosacáridos por medio de una membrana de 0.45 μm para eliminar sólidos y partículas de mayor tamaño.

Diagrama 3. Diagrama de Análisis de Fibra Dietética Soluble



4.4.3 Curva Patrón de Hidratos de Carbono Cuantificados

4.4.3.1 Inulina

Para la cuantificación de inulina en los diferentes lotes de cebolla morada (*Allium cepa*) se elaboró una curva patrón a partir de una muestra estándar de dicho hidrato de carbono. En

la **Tabla 5** se presentan las áreas correspondientes a las soluciones estándar de inulina empleadas para la elaboración de la curva patrón.

Inulina y FOS (mg/mL)	Área
0.2	115001.50
0.4	236079.33
0.6	289966.67
1.0	584726.00
1.5	1070623.33
2.0	1409398.33

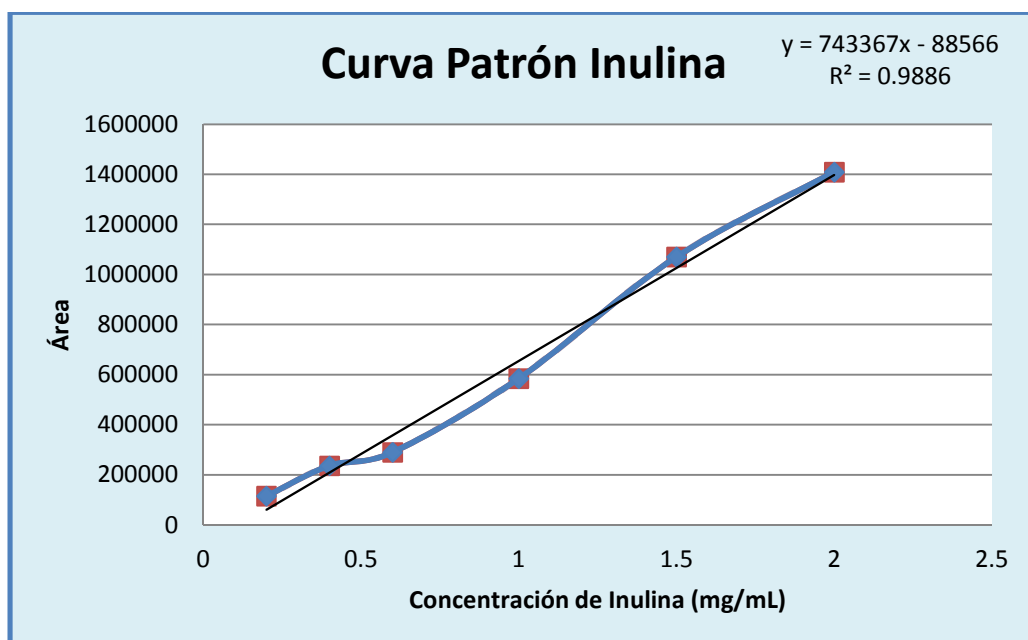


Figura 6. Curva patrón de Inulina

En la **Figura 6** se presenta en forma ilustrativa la curva patrón de inulina.

A partir de la ecuación de regresión final, se despeja x:

$$x = \frac{y + 88566}{743367}$$

Se sustituye el área:

- Muestra A1 de cebolla morada

$$x = \frac{641363 + 88566}{743367} = 0.9819 \text{ mg inulina /mL}$$

$$\left[\frac{0.9819 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \right] \left[\frac{25 \text{ mL}}{0.5 \text{ g mtra.}} \right] \left[100 \text{ g mtra.} \right] = \frac{4909.61 \text{ mg de inulina}}{100 \text{ g mtra.}}$$

4.4.3.2 Glucosa

Para la cuantificación de glucosa en los diferentes lotes de cebolla morada (*Allium cepa*) se elaboró una curva patrón a partir de una muestra estándar de dicho hidrato de carbono.

En la **Tabla 6**, se presentan las soluciones de glucosa y sus áreas respectivas empleadas para la elaboración de la curva patrón de dicho carbohidrato.

Tabla 6. Concentración de las soluciones de glucosa y el área correspondiente

Glucosa (mg/mL)	Área
1	313647.67
2	718514.67
6	1909888.67
7	2189377.33

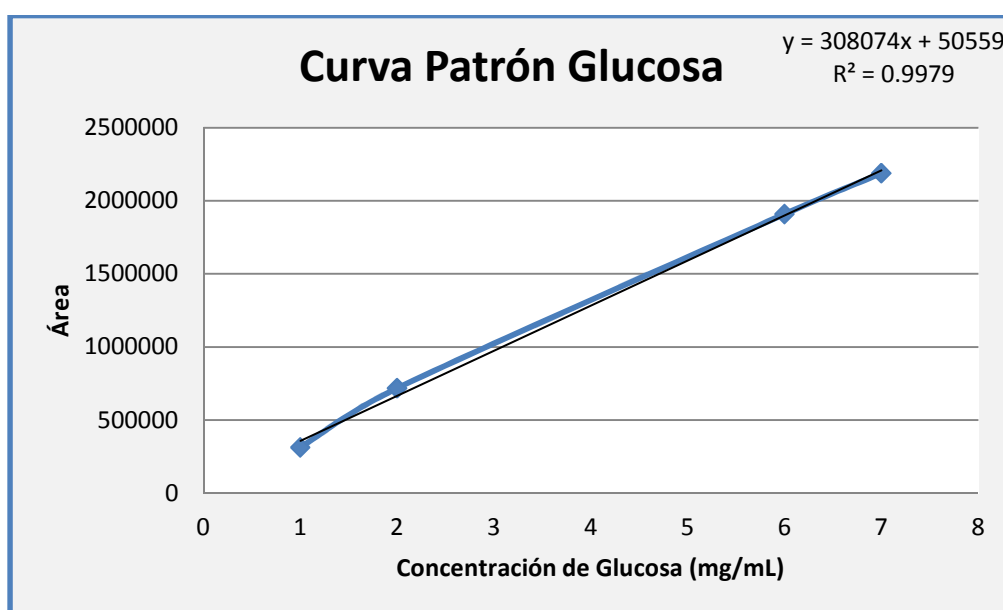


Figura 7. Curva patrón de Glucosa

En la **Figura 7** se presenta la curva patrón de inulina así como la ecuación de regresión lineal.

A partir de la ecuación de regresión final, se despeja x:

$$x = \frac{y - 50559}{308074}$$

Se realizaron los siguientes cálculos continuando con el mismo procedimiento para la determinación del contenido de glucosa. Se obtiene la ecuación de regresión lineal donde se despeja x:

$$x = \frac{y - 50559}{308074}$$

Se sustituye el área:

- Muestra A1 de cebolla morada

$$x = \frac{558959 - 50559}{308074} = 1.6502 \text{ mg glucosa /mL}$$

$$\left[\frac{1.6502 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \right] \left[\frac{25 \text{ mL}}{0.5 \text{ g mtra.}} \right] \left[\frac{100 \text{ g mtra.}}{100 \text{ g mtra.}} \right] = \frac{8251.2643 \text{ mg de glucosa}}{100 \text{ g mtra.}}$$

Una vez que se despejo X de las dos ecuaciones de regresión lineal, se emplearán para sustituir las áreas correspondientes a cada hidrato de carbono y, por correlación gráfica, conocer la concentración de inulina y glucosa en cada cromatograma. En base al valor de R² se toma como referencia para indicar que se puede utilizar la ecuación de regresión lineal para calcular las concentraciones de inulina y glucosa.

Cada lote se trabajó por triplicado, muestra A, B y C; a su vez, cada muestra se trabajó con un numero de replicas variado, van de 6 a 9 cromatogramas obtenidos.

4.5 Determinación Cuantitativa de Inulina

Una vez realizada la extracción acuosa de inulina, se analiza el extracto por medio de un equipo de CLAR con ayuda de una columna cromatográfica de exclusión molecular.

4.5.1 Material y Reactivos

- a) Viales Waters de 2 mL
- b) Columna Shodex modelo SP0810, 8.0 mm ID X 300 mm
- c) Detector de Índice de Refracción marca Waters modelo 2410
- d) Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) marca Waters modelo 2695
- e) Acetonitrilo grado HPLC
- f) Fase móvil agua:acetonitrilo (95:05)
- g) Solución estándar de inulina de achicoria (SIGMA 2326843)

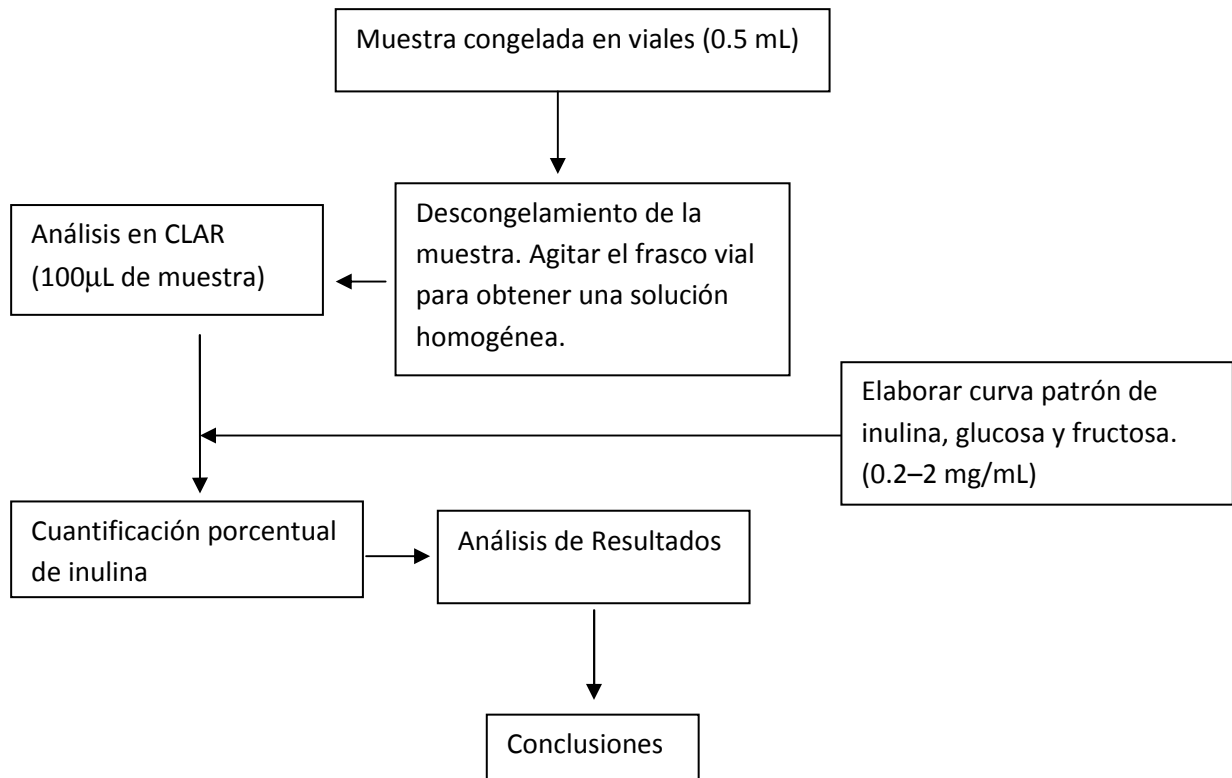
Preparación de Reactivos

- ✓ Prepara 1 L de fase móvil: colocar 50 mL de acetonitrilo grado HPLC, en un matraz aforado de 1 L. Aforar con agua destilada y desionizada grado HPLC.
- ✓ Pesar 25 mg de inulina de achicoria, disolverla en agua destilada y desionizada y aforar a 5 mL.

4.5.2 Procedimiento

- ✓ Encender el equipo de CLAR y acondicionar la columna Shodex a 65 °C y un flujo de 0.4 mL/minuto. La temperatura de la muestra permanece a 30 °C. Se purga el detector de IR con fase móvil durante 30 min.
- ✓ Se inyecta primeramente la solución estándar de inulina de achicoria (SIGMA 2326843) por quintuplicado y, posteriormente, se inyectan las muestras purificadas por triplicado.

Diagrama 4. Diagrama de Determinación Cuantitativa de Inulina



4.6 Métodos Propuestos para la Extracción de Inulina

Una vez que el material biológico se acondicionó (secado y molido) y se conoce la concentración de inulina en cada uno de los lotes estudiados; se procede a realizar la extracción de inulina con aquel lote que presentó la mayor concentración de inulina, así como su cuantificación con cada uno de los métodos propuestos y determinar cual método de extracción da mayor rendimiento.

4.6.1 Método de Ultrafiltración

Es un método de extracción de inulina que emplea una membrana con determinado tamaño de poro tal que, aplicando una presión positiva con un gas inerte a la muestra, permita la separación de una solución rica en inulina.

❖ Materiales y Reactivos

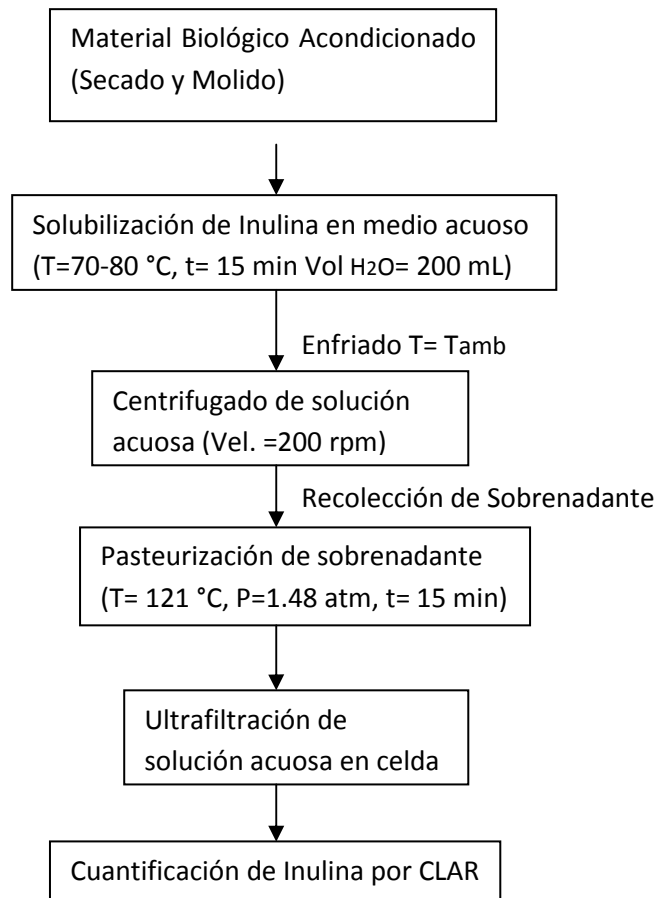
- a) Parrilla de agitación CIMAREC Modelo Sp131635

- b) Vaso de precipitados Pyrex 1 Litro.
- c) Centrifuga Sorvall RC-5B
- d) Autoclave PS/RSV Series
- e) Celda de Ultrafiltración Amicon Modelo 8400
- f) Membrana de Ultrafiltración
- g) Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) marca Waters modelo 2695
- h) Agua destilada y desionizada

❖ Procedimiento

- ✓ Pesar 20 g de material biológico acondicionado y colocarlo en un vaso de precipitados de 1 L.
- ✓ Agregar 200 mL de agua destilada y desionizada.
- ✓ Colocar el vaso de precipitados de 1 L en una parrilla eléctrica y llevar la solución acuosa a $T=70-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.
- ✓ Después de la solubilización de la inulina, enfriar la solución acuosa a $T= T_{\text{amb}}$
- ✓ Centrifugar la solución acuosa a $\text{Vel}= 200\text{ rpm}$ y recolectar el sobrenadante.
- ✓ Pasteurizar el sobrenadante ($T= 121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P= 1.48\text{ atm}$, $t= 15\text{ min}$) para la hidrólisis de proteínas y la desnaturalización de enzimas.
- ✓ Ultrafiltrar la solución acuosa empleando una celda de ultrafiltración y una membrana.
- ✓ Cuantificar el contenido de inulina por CLAR

Diagrama 5. Extracción de Inulina por el Método de Ultrafiltración



4.6.2 Sistema de Filtraciones con Celita Proceso #1.

Es un método de extracción de inulina que consiste en obtener una muestra con alta concentración de inulina a través de un filtro de Celita con el fin de minimizar el tiempo de extracción de inulina.

❖ Materiales y Reactivos

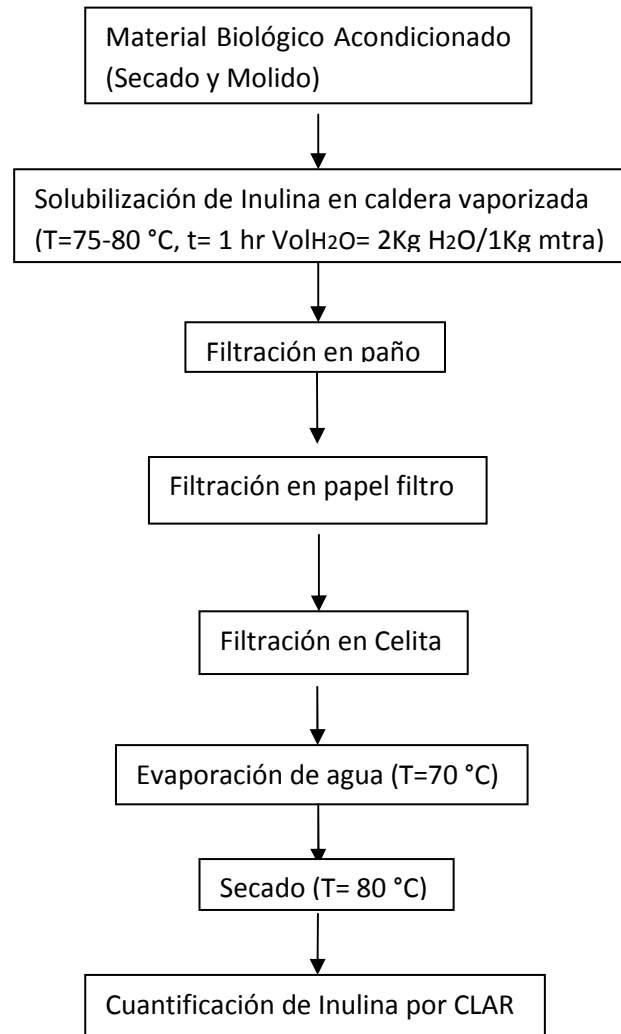
- Vaso de precipitados 1 Litro
- Parrilla de agitación CIMAREC Modelo Sp131635
- Crisol Gooch Porosidad #2
- Fuente de vacío con trampa

- e) Embudo de filtración
- f) Trozo de paño 20X20 cm (50 hilos/pulgada²)
- g) Papel filtro (Porosidad= 15-20 μm) (50 equivalentes Whatman)
- h) Celita (99.99 % pureza, Catálogo 124K8813, Marca Sigma)
- i) Estufa con temperatura controlada y aeración Lab-line imperial 3
- j) Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) marca Waters modelo 2695

❖ Procedimiento

- ✓ Pesar 20 g de material biológico acondicionado y colocarlo en un recipiente de peltre de 1 L con tapa.
- ✓ Agregar 40 mL de agua destilada y desionizada.
- ✓ Colocar el recipiente de peltre de 1 L en una parrilla eléctrica y tapar. Llevar la solución acuosa a $T=70-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hr.
- ✓ Posteriormente, filtrar empleando un paño como medio filtrante.
- ✓ Filtrar por segunda ocasión empleando papel filtro (Porosidad= 15-20 μm).
- ✓ Por último, filtrar empleando una capa de Celita.
- ✓ Evaporar la mayor cantidad de agua (50-70 %) a $T= 70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- ✓ Secar la solución acuosa $T= 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta obtener una pasta.
- ✓ Cuantificar el contenido de inulina por CLAR.

**Diagrama 6. Extracción de Inulina por el Método de Sistema de Filtración con Celita
Proceso #1**



4.6.3 Modificaciones al Sistema de Filtraciones con Celita. Proceso #2

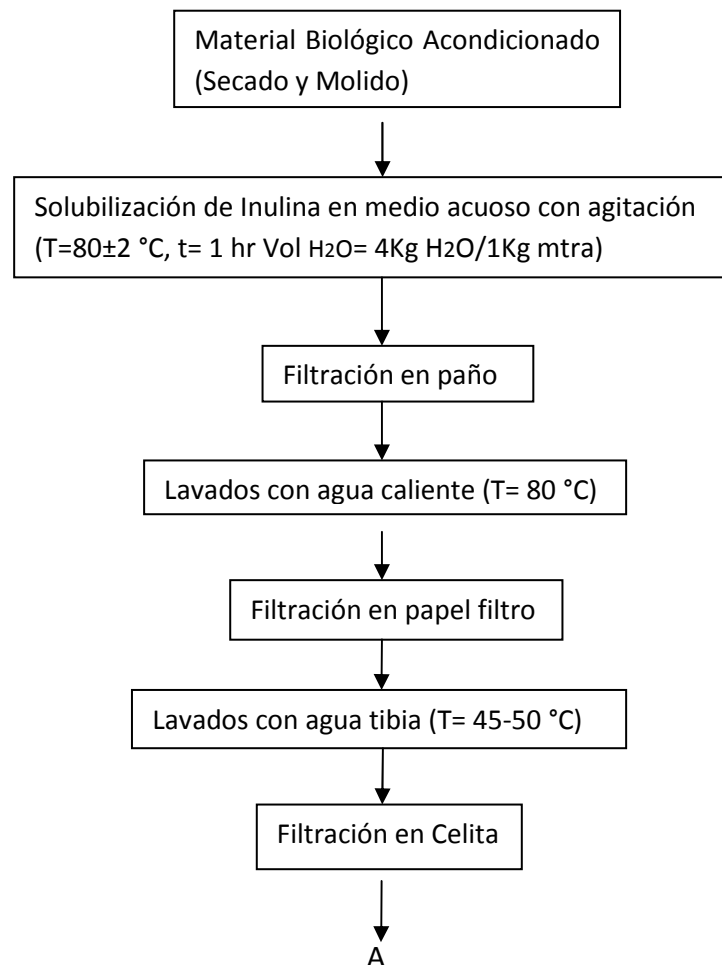
Se realizaron modificaciones al procedimiento experimental con el fin de minimizar el grado de desnaturalización de inulina y obtener un mayor recobro de dicho prebiótico mediante la extracción con filtración con Celita.

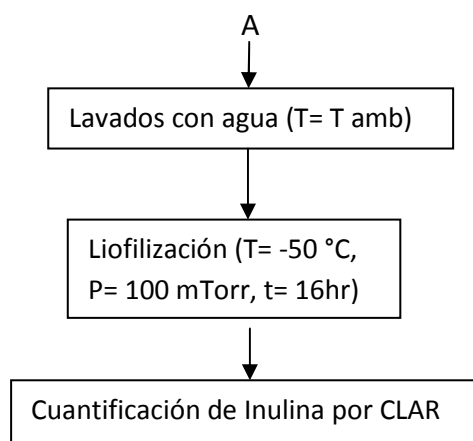
❖ Procedimiento

- ✓ Pesar 20 g de material biológico acondicionado y colocarlo en un vaso de precipitados de 1 L.
- ✓ Agregar 80 mL de agua destilada y desionizada.

- ✓ Colocar el vaso de precipitados de 1 L en una parrilla eléctrica. Llevar la solución acuosa a $T=80\pm 2$ °C durante 1 hr.
- ✓ Posteriormente, filtrar empleando un paño como medio filtrante.
- ✓ Realizar serie de lavados (2-3) con agua destilada y desionizada caliente ($T=80^{\circ}\text{C}$).
- ✓ Filtrar por segunda ocasión empleando papel filtro (Porosidad= 15-20 μm).
- ✓ Realizar una serie de lavados (2-3) con agua destilada y desionizada tibia ($T=45-50^{\circ}\text{C}$).
- ✓ Por último, filtrar empleando una capa de Celita.
- ✓ Realizar una serie de lavados (2-3) con agua destilada y desionizada $T= T_{\text{amb}}$
- ✓ Liofilizar la solución acuosa $T= -50$ °C, $t= 16$ hr, $P= 100$ mTorr
- ✓ Cuantificar el contenido de inulina por CLAR.

Diagrama 7. Extracción de Inulina por el Método de Sistema de Filtración con Celita
Proceso #2





4.6.4 Método de Filtración Agua 80/ EtOH 20

Método de extracción de inulina que se caracteriza por emplear como medio de extracción una solución acuoso/alcohólica. La función del etanol es modificar la constante dieléctrica del medio para favorecer la extracción de la fracción soluble de la fibra dietética que es donde se encuentra la inulina.

❖ Material y Reactivos

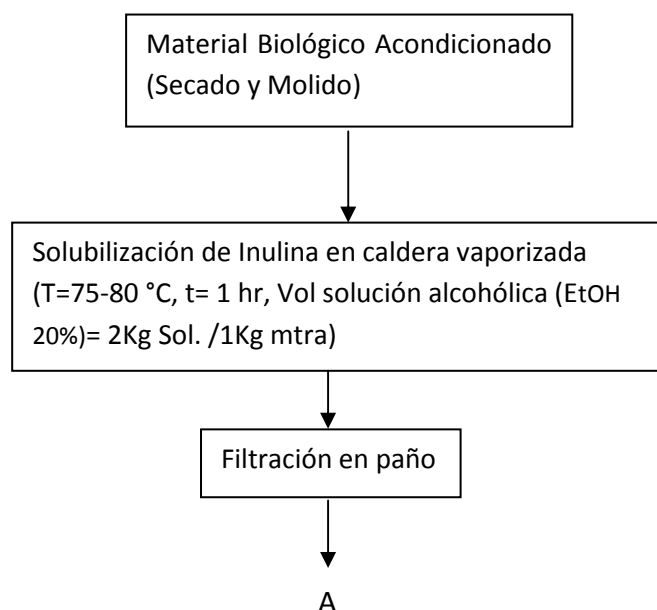
- a) Vaso de precipitados 1 Litro
- b) Parrilla de agitación CIMAREC Modelo Sp131635
- c) Crisol Gooch Porosidad #2
- d) Fuente de vacío con trampa
- e) Embudo de filtración
- f) Trozo de paño 20X20 cm (50 hilos/pulgada²)
- g) Papel filtro (Porosidad= 15-20 μm) (equivalente Whatman #50)
- h) Celita (99.99% pureza, Catálogo 124K8813, Marca Sigma)
- i) Estufa de vacío con temperatura controlada y aeración Lab-Línea Duo-Vac Oven Modelo 3620

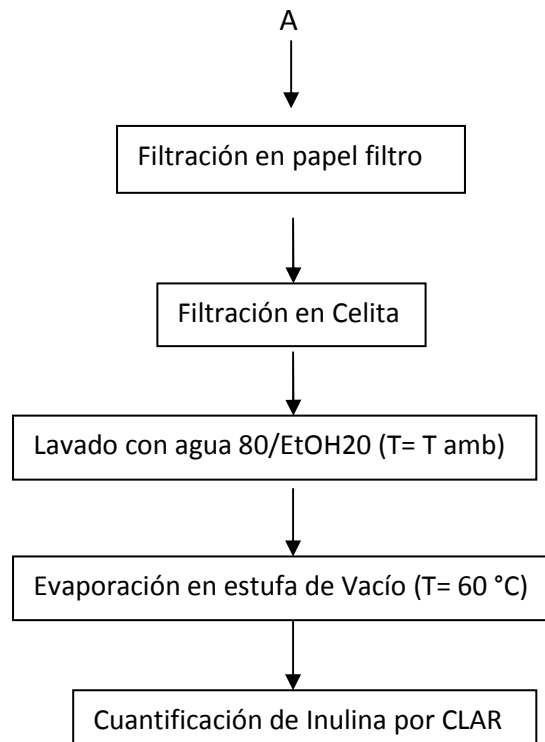
j) Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) marca Waters modelo 2695

❖ Procedimiento

- ✓ Pesar 20 g de material biológico acondicionado y colocarlo en un vaso de precipitados de 1 L.
- ✓ Agregar 40 mL de solución alcohólica (80 mL de agua destilada y desionizada y 20 mL de Etanol 20%).
- ✓ Colocar el vaso de precipitados de 1 L en una parrilla eléctrica. Llevar la solución alcohólica a T= 75-80 °C durante 1 hr.
- ✓ Posteriormente, filtrar empleando un paño como medio filtrante.
- ✓ Filtrar por segunda ocasión empleando papel filtro (Porosidad= 15-20 µm).
- ✓ Por último, filtrar empleando una capa de Celita.
- ✓ Evaporar la mayor cantidad de agua (50-70%) en estufa de vacío a T= 60 °C
- ✓ Secar la solución acuosa T= 80 °C hasta obtener una pasta.
- ✓ Cuantificar el contenido de inulina por CLAR.

Diagrama 8. Extracción de Inulina por el Método de Filtración Agua 80/EtOH 20





4.6.5 Método de Secado

El proceso de secado se considera una operación unitaria que consiste en separar grandes cantidades de agua de un material sólido hasta obtener un valor aceptablemente bajo de humedad.

❖ Materiales y Reactivos

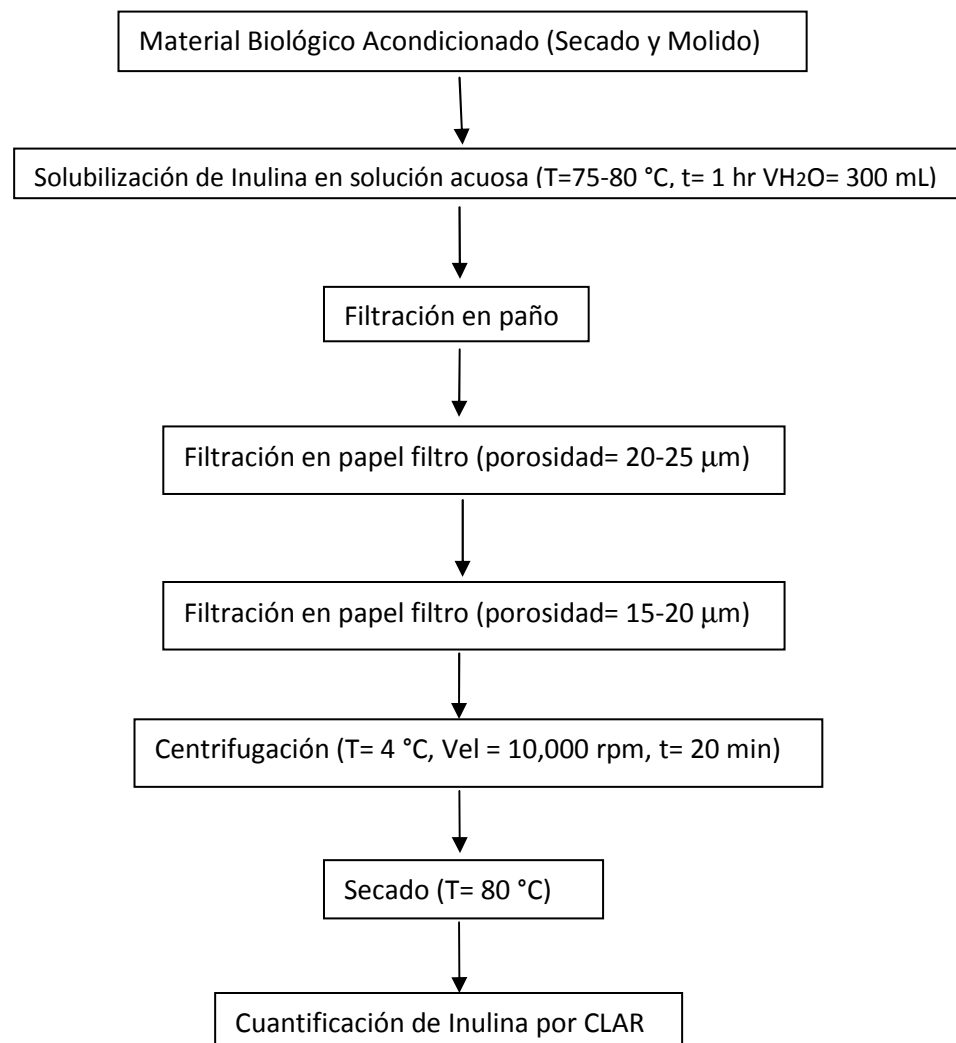
- a) Vaso de precipitados 1 Litro
- b) Parrilla de agitación CIMAREC Modelo Sp131635
- c) Crisol Gooch Porosidad #2
- d) Fuente de vacío con trampa
- e) Embudo de filtración
- f) Trozo de paño 20X20 cm (50 hilos/pulgada²)
- g) Papel filtro (Porosidad= 15-20 μm) (equivalente Whatman #50)
- h) Estufa con temperatura controlada y aeración Lab-line imperial 3

i) Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) marca Waters modelo 2695

❖ Procedimiento

- ✓ Pesar 20 g de material biológico y colocarlo en un vaso de precipitados de 1 L.
- ✓ Agregar 300 mL de agua destilada y desionizada.
- ✓ Filtrar empleando papel filtro (porosidad 20-25 μm)
- ✓ Filtrar por segunda ocasión empleando papel filtro (porosidad 15-20 μm)
- ✓ Centrifugación de solución acuosa $T= 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{Vel}= 10,000\text{ rpm}$ $t= 20\text{ min}$
- ✓ Secado de la solución acuosa $T= 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta obtener un grumos.
- ✓ Cuantificar el contenido de inulina por CLAR.

Diagrama 9. Extracción de Inulina por el Método de Secado



4.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se emplea para conocer si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos, además de proporcionar un panorama de visualización que tienen los parámetros controlables sobre la variable de respuesta, dicho análisis estadístico se aplica a las concentraciones de inulina en cada lote y en cada método de extracción. En general, se calculo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

4.7.1 Humedad y Fibra Dietética Total

Para el caso de la humedad y la fibra dietética total se calculo el valor promedio, se determino la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

4.7.2 Inulina

Para el caso de inulina, una vez conocidas las concentraciones en cada lote, se procede a calcular el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV); Posteriormente, al llevar a cabo la comparación de los datos promedio realizando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rango múltiple (DUNCAN) para determinar si existe diferencia significativa entre el contenido de inulina de acuerdo a la procedencia del lote y que lote contiene la mayor concentración por estadística significativa.

4.7.3 Método de Extracción

Una vez realizado los diferentes procesos de extracción y determinado la concentración de inulina, también se calcula el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV); y como variable de respuesta se calcula el % de rendimiento de cada método y se utiliza el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa entre los métodos propuestos, por si es el caso, solucionar aquel proceso que dé el mejor rendimiento.

5. Resultados y Análisis

5.1 Determinación de humedad

En la **Tabla 7** se muestra de manera resumida el contenido de humedad de cada uno de los lotes estudiados.

Tabla 7. Contenido de Humedad en cada Lote de Cebolla Morada Analizado

LOTE	MASA DE MUESTRA HÚMEDA	% HUMEDAD *
1	1295.70	88.72 ± 0.62
2	1758.90	89.78 ± 4.12
3	1400.10	87.64 ± 4.32
4	1450.40	88.71 ± 2.74
5	821.00	88.75 ± 1.92
Promedio General		88.72 ± 0.75

* Valor promedio ± desviación estándar

La cebolla morada es una fuente vegetal con gran cantidad de agua, posee una humedad promedio de 88.72%; por lo tanto, para facilitar la molienda, maximizar la extracción enzimática de inulina y determinar cuantitativamente el contenido de fibra dietética se retira dicho componente mayoritario.

A continuación en la **Tabla 8** se resume el número de réplicas empleadas para la cuantificación de hidratos de carbono a partir de los cinco lotes estudiados, así como su lugar de compra y procedencia de adquisición.

Las réplicas fueron tomadas aleatoriamente de la muestra de cebolla morada molida y seca.

Tabla 8. Número de Réplicas y Procedencia de Adquisición de los Diferentes Lotes Analizados

LOTE	REPLICAS	PROCEDENCIA
1	A	El lote fue comprado en Tienda UNAM.
	B	
	C	
2	A	Este lote fue comprado en la Central de Abastos de Texcoco.
	B	
	C	
3	A	Lote de cebolla morada adquirida por medio del consorcio Walt Mart.
	B	
	C	
4	A	El lote fue adquirido en un tianguis de Tlalnepantla.
	B	
	C	
5	A	El lote fue comprado en un tianguis de Coacalco.
	B	
	C	

5.2 Determinación de Fibra Dietética Total

La **Tabla 9** resume los datos del contenido de Fibra Dietética Total así como los datos promedios de cenizas y proteína que se emplean para el cálculo. Para conocer el contenido de fibra total se realiza restando el contenido de cenizas y proteína. Se reporta en base seca y en base húmeda.

Debido a que en la determinación de fibra dietética total se trabajó con muestra seca se debe considerar la humedad original para reportar este componente en base húmeda. El promedio de fibra dietética total es de 1.89% en base húmeda; por lo tanto, se ajusta el dato a base seca correspondiendo a 16.83%. (Siendo él % FDT teórico = 1.80% Fuente: Instituto de Nutrición, el % FDT experimental = 1.89% y se considera como un dato de referencia el cual se empleara para posteriores cálculos)

Tabla 9. Fibra Dietética Total

Replica	Residuo (g)	Cenizas (g)	Proteína (g)	Muestra (g)	% FDT (Base Seca)	% FDT (Base Húmeda)
A	0.1082	0.0244	9.0550E ⁻⁴	0.5052	16.39	1.84
B	0.1117	0.0244	9.0550E ⁻⁴	0.5072	17.02	1.92
C	0.1119	0.0244	9.0550E ⁻⁴	0.5062	17.09	1.92
Promedio					16.83	1.89
Desviación Estándar					0.38	0.04
Coeficiente de Variación					2.27	2.27

El propósito de cuantificar el contenido de fibra dietética es para determinar qué porcentaje posee la fracción de inulina, además de proporcionar un panorama general que posee dicho prebiótico en la fuente vegetal. Debido a que la fibra dietética es una mezcla compleja de hidratos de carbono y está fuertemente ligada a los demás componentes nutricionales de la cebolla morada fue necesario realizar una digestión enzimática para aislarla y considerar el contenido de cenizas y proteína ya que siguen perteneciendo a una matriz muy compleja donde se encuentra la inulina.

La **Tabla 10** presenta el porcentaje que representa el contenido de inulina total dentro del contenido de fibra dietética total en la cebolla morada.

Tabla 10. Porcentaje de inulina en el contenido de Fibra Dietética Base Húmeda

Lote	Contenido de Inulina (mg/100 Muestra <small>base húmeda</small>)	% Inulina en referencia a FDT
1	511.38	26.91
2	594.36	26.02
3	243.24	12.80
4	541.23	28.49
5	588.24	30.96

El contenido de inulina en la fibra dietética total va de 12.80% a 30.96%, esta gran diferencia se debe a que interviene y afecta el lugar de procedencia de la cebolla morada (*Allium cepa*). El porcentaje más bajo de inulina (12.80%) corresponde a la muestra de cebolla morada que se adquirió en la Tienda Comercial Superama el cual, siendo de importación, el porcentaje bajo se debe a deterioro debido en función del tiempo y transporte de la cebolla morada; así que, descartando dicho dato el intervalo de contenido del prebiótico en estudio se reduce de 26.02% a 30.96% donde los lotes fueron adquiridos en la zona Metropolitana y Distrito Federal.

5.3 Concentración de Inulina y Glucosa en los Lotes Estudiados

La **Tabla 11** agrupa las concentraciones promedio de inulina y glucosa. Se puede comparar tanto los datos en Base Seca como en Base Húmeda así como desviación estándar. En la parte inferior de la tabla, se reporta el dato de ANOVA para inulina y glucosa que indica que hay diferencia significativa en las concentraciones de cada lote; por lo cual se emplea la prueba de rango múltiple para ver que lotes presentaban diferencia entre sí.

Tabla 11. Concentración Promedio de Inulina y Glucosa en cada Lote analizado

LOTE	NUMERO DE INYECCIONES	Base Seca		Base Húmeda	
		CONCENTRACIÓN DE INULINA (mg/100g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/100g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE INULINA (mg/100g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/100g DE MUESTRA)
1	4	4,533.55 ± 721	8,455.67 ± 341	511.38 ± 81	953.79 ± 38
2	6	4,382.65 ± 1106	8,086.29 ± 452	422.03 ± 47	913.05 ± 51
3	3	2,156.41 ± 89	4,598.82 ± 835	243.24 ± 10	518.74 ± 94
4	8	4,798.15 ± 197	249,714.88 ± 91,869	538.88 ± 22	31,610.52 ± 906
5	4	5,214.94 ± 514	194,175.42 ± 80,666	588.24 ± 68	21,902.98 ± 1,229
F experimental				10.966	49.318

CV < 15 %

El lote de cebolla con mayor contenido de inulina corresponde al lote #5, junto con los lotes de cebolla #1 y #2 poseen concentraciones de inulina sin diferencia significativa y, por último, el lote #3 es el que contiene la menor concentración de dicho prebiótico; para el caso de la glucosa, el lote con mayor concentración corresponde al lote #4 seguido del lote #5, la diferencia de concentración de glucosa con respecto a los lotes #1, #2 y #3 se atribuye a varias causas, entre ellas, concentración normal inicial de glucosa en la cebolla morada, hidrólisis de disacáridos y grado de maduración de la cebolla morada.

El análisis de varianza demuestra que, en relación al valor de f obtenida para inulina y glucosa si hay diferencia significativa entre los cinco lotes de inulina. La prueba de rango múltiple DUNCAN nos permite discriminar dentro de los lotes en donde se presenta la diferencia significativa estadísticamente.

Las concentraciones de glucosa son mayores que las concentraciones de inulina, y se atribuye a que durante el procedimiento de extracción los polímeros, oligosacáridos y otros hidratos de carbono de mayor tamaño se hidrolizaron en presencia de las enzimas α -amilasa termoestable, proteasa y amiloglicosidasa generando monómeros de glucosa que no se alcanzan a retener en los diferentes filtros y son cuantificados por la columna cromatográfica.

En la **Figura 8** y en la **Figura 9**, se presenta en forma ilustrativa el contenido de inulina en base seca y en base húmeda respectivamente de los diferentes lotes analizados. Se puede apreciar de manera notoria que el lote 3 posee la menor concentración de inulina y el lote 5 tiene la mayor concentración de dicho prebiótico. Gráficamente, el lote 1, 2, 4 y 5 tienen una cantidad de inulina semejante que cualquiera de ellos se puede emplear para realizar la extracción.

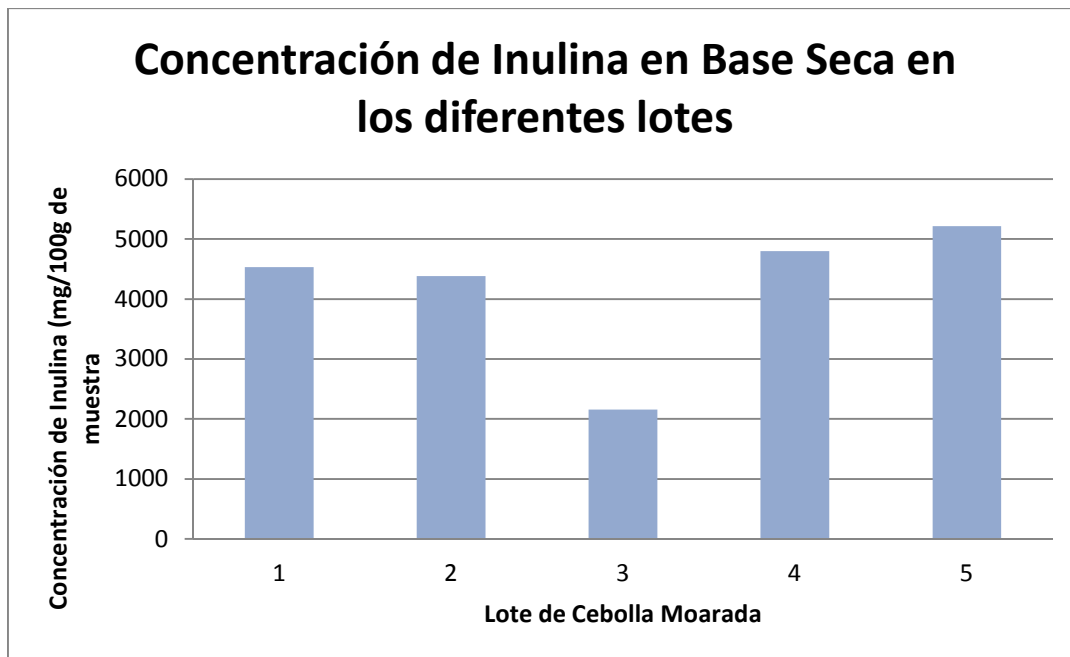


Figura 8: Presentación de barras del contenido de inulina en base seca en los diferentes lotes estudiados.

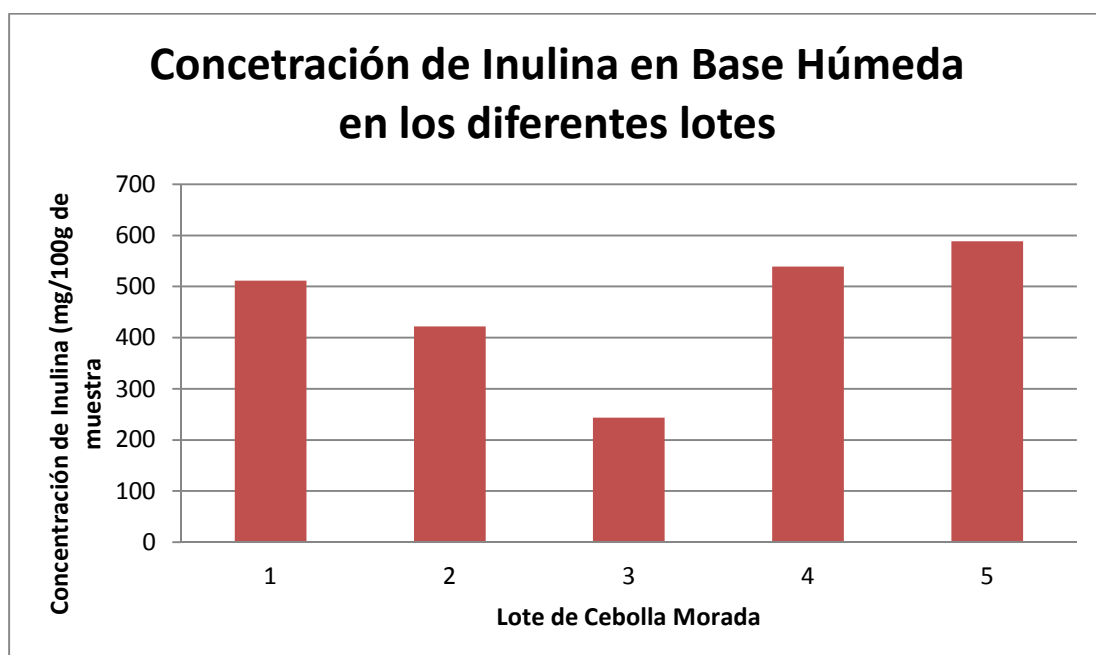


Figura 9: Presentación de barras del contenido de inulina en base húmeda en los diferentes lotes estudiados.

El procedimiento experimental de las muestras de cebolla morada (*Allium cepa*) consistió en un análisis cromatográfico empleando un equipo de HPLC. Se trabajó con 5 lotes de cebolla morada, adquirida en diferentes lugares del área Metropolitana y de la Ciudad de México.

Con el estudio experimental de trabajo se puede demostrar que la cebolla morada (*Allium cepa*) es una de las fuentes naturales con mayor contenido de inulina; por lo tanto, se considera como una buena fuente de dicho prebiótico para su extracción y uso en el territorio nacional debido a que es un producto vegetal poco exigente respecto a las condiciones climatológicas y geográficas (T= 15-24 °C, Humedad Relativa baja).

Se decidió llevar a cabo una comparación cuantitativa entre diferentes lotes de cebolla morada para determinar si el contenido de inulina está afectado por la zona de adquisición que podría estar relacionado a la procedencia de dicho lote. La procedencia geográfica de los diferentes lotes se especifica en la **Tabla 8**. Cabe mencionar que los lotes 1 y 3 fueron adquiridos en el Distrito Federal y los lotes 2, 3 y 5 fueron comprados en el área Metropolitana del Estado de México.

En general se observa que el contenido de inulina en los diferentes lotes es homogéneo a excepción del lote 3, el cual fue adquirido en una tienda de autoservicio de nominación extranjera. Con respecto al lugar de adquisición no se puede establecer una correlación pues el contenido de los lotes 1 y 2 (provenientes de tiendas de autoservicio de nominación nacional) son similares a los valores encontrados para los lotes 4 y 5 provenientes de mercados.

La diferencia observada entre los diferentes lotes, especialmente en el lote 3, se atribuye en gran medida al origen vegetal y microbiano así como, al tratarse de un hidrato de carbono de reserva en la planta como es la inulina, posiblemente la planta requiere y metaboliza dicho carbohidrato para realizar sus funciones biológicas y bioquímicas. El contenido de inulina también se atribuye al tiempo de maduración de la planta antes y después de que sea cortado el bulbo de la cebolla morada de la estructura completa de la

planta ya que dicho periodo biológico es inversamente proporcional a la cantidad de inulina que disponga la planta.

Una vez conocido el valor de concentración de inulina en cada lote de cebolla, se procedió a evaluar los métodos de extracción encontrados en la literatura para seleccionar el proceso y las condiciones óptimas para obtener un buen rendimiento.

5.4 Concentración de Inulina y Glucosa por los Métodos de Extracción y sus Modificaciones

Se propusieron 5 métodos de obtención de inulina a partir de cebolla morada que se caracterizan por extraer de manera cuantitativa dicho prebiótico. Los 5 métodos parten del principio básico de solubilizar los polímeros de inulina a T=80 °C durante 1 hora, después se realiza una filtración para la eliminación de partículas grandes. Posterior a la filtración se marca la diferencia entre cada método.

La **Tabla 12** resume la concentración promedio de inulina y de glucosa en base seca obtenida en cada método de extracción y el número de inyecciones empleadas para los cálculos.

Tabla 12. Concentración Promedio de Inulina y Glucosa en cada Lote Analizado

B a s e S e c a			
MÉTODO	NUMERO DE INYECCIONES	CONCENTRACIÓN DE INULINA (mg/100g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/100g DE MUESTRA)
Ultrafiltración	6	1,198.07 ± 26.23	28,486.40 ± 576.18
Filtración con Celita proceso #1	9	2,144.78 ± 1,682.69	41,876.35 ± 4,532.03
Filtración con Celita proceso #2	6	3,908.21 ± 114.51	388.16 ± 76.41
Filtración con Agua 80/ Etanol 20 Secado T=80°C	9	1,980.67 ± 69.94	1,748.59 ± 358.83
ANOVA		1486077.4	

Promedio ± DE. CV < 3 %. El CV en Filtración con Celita proceso #1 = 78.45%

La **Tabla 13** muestra las concentraciones promedio para inulina y para glucosa en base húmeda obtenidas por medio de los diferentes métodos de extracción aplicados, así como el número de inyecciones tomados para los cálculos.

Tabla 13. Concentración Promedio de Inulina y Glucosa en cada lote analizado

B a s e H ú m e d a		
MÉTODO	CONCENTRACIÓN DE INULINA (mg/100g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/100g DE MUESTRA)
Ultrafiltración	135.14 ± 2.95	3,213.26 ± 64.99
Filtración con Celita #1	241.93 ± 189.80	472.65 ± 511.21
Filtración con Celita #2	440.84 ± 12.91	47.68 ± 8.61
Filtración con Agua 80%/Etanol 20%	223.80 ± 7.88	197.24 ± 40.47
Secado T=80°C	605.32 ± 4.46	99.61 ± 68.24
ANOVA	1486077.4	

Promedio ± DE. El CV en Filtración con Celita proceso #1 = 78.45%

De los 5 métodos de extracción de inulina que se desarrollaron tienen relevancia el método de sistema de filtraciones con Celita. Tanto en la **Tabla 12** y **Tabla 13** se aprecia que se obtiene una baja recuperación de inulina durante el Proceso #1 respecto al Proceso #2; siendo el mismo método de extracción, se hicieron modificaciones en la metodología para mejorar el rendimiento. Dichas modificaciones son el incremento de la temperatura de solubilidad de inulina, serie de lavados con agua al filtrado durante las diferentes etapas de filtración y proceso de liofilización.

La glucosa tiene una mayor variabilidad en su concentración en los diferentes métodos debido a las condiciones de temperatura, tiempo y pH de cada una de las operaciones unitarias de cada método. Sin embargo, enfocándose en el método de sistema de filtraciones se tiene un mayor recobro de glucosa en el proceso #2 respecto al proceso #1

debido a un mayor cuidado y atención en los parámetros específicos y modificaciones que se le hacen al método de extracción por sistema de filtraciones con Celita.

El método de ultrafiltración se caracteriza por realizar una filtración empleando una membrana con tamaño de poro del rango de micrómetros aplicando presión por encima de la solución y de la membrana (presión positiva) con un gas inerte a la muestra, en este caso se empleo nitrógeno molecular. La desventaja de este método se enfoca en el tiempo necesario para realizar la ultrafiltración, va desde 10 a 12 horas en dos sesiones de trabajo; además, debido a la adherencia de gran cantidad de solutos y partículas suspendidas en la membrana empleada, esta se satura con facilidad por su baja porosidad.

El método de filtración se caracteriza por emplear Celita (piedra de diatomeas) ya que favorece la extracción exclusiva de la inulina. La desventaja de este método sucede cuando se satura la Celita lo que provoca una lenta filtración conforme pasa el tiempo, con lo que es necesario cambiar la capa de Celita, la ventaja radica en la facilidad del procedimiento experimental así como la disponibilidad de material. Es importante mencionar que este método se repitió modificándose y reconsiderando parámetros más específicos tales como los filtrados ricos en inulina, los tiempos de filtrado y las condiciones de extracción favoreciendo la obtención de la mayor cantidad posible de inulina.

El método de filtración con etanol no difiere mucho del método de filtración con Celita, la única diferencia es el medio de solución el cual está compuesto por 80 partes de agua y 20 partes de etanol. El objetivo de emplear etanol es precipitar la mayor cantidad de la fibra dietética insoluble, pero el bajo rendimiento se atribuye a que la inulina y los fructanos tienen menor solubilidad en una solución alcohólica a temperatura ambiente por lo que precipitaron en la membrana de Celita.

El método de secado no es estrictamente un método de extracción, es una modificación donde se añade una operación unitaria que se especializa en llevar a evaporación una solución de inulina después de haberla filtrado y/o centrifugado. La desventaja de este método es que en la solución están presentes una gran cantidad de monosacáridos disueltos, además de que, con el largo tiempo de secado la alta temperatura favorece la hidrólisis de los polímeros de inulina y fructanos. El rendimiento excedente es de 112.33% respecto a la concentración de inulina del lote 4, y se atribuye a que no solamente existe inulina en la solución acuosa, sino también se cuantificó monosacáridos y disacáridos provenientes del material biológico.

5.5 Rendimiento de Extracción

La **Tabla 14** muestra el porcentaje de rendimiento de obtención de inulina en cada método de extracción diseñado.

Tabla 14. Rendimiento de Inulina Obtenida con Diferentes Modificaciones al Método de Extracción en el Lote 4

Método	Rendimiento de Obtención de Inulina (%)
Ultrafiltración	24.96
Sistema de Filtraciones con Celita proceso #1	47.70
Sistema de Filtraciones con Celita proceso #2	81.45
Filtración con Agua 80% / Etanol 20%	41.53
Secado T = 80 °C	112.33
F experimental	1229.03

Tomando en consideración el análisis de varianza, la $F_{\text{experimental}}$ resulta de 1229.03, siendo un valor demasiado alto resalta que existe una diferencia significativa considerable y notoria entre los métodos de extracción cuantitativos de inulina.

En base al % de rendimiento de obtención de inulina se aprecia que el sistema de filtraciones con Celita es el método más idóneo para realizar la extracción de inulina a nivel industrial ya que se recupera un 81.45% de inulina. Se aprecia que en la primera prueba

experimental (Celita proceso #1), éste método tiene un bajo porcentaje de recuperación de 47.70%; posteriormente la repetición de la misma prueba de extracción aproximadamente duplica dicho porcentaje de recuperación de inulina, esto se atribuye a que se incrementó el grosor de la capa de Celita y se procuró el manejo cuidadoso de los filtrados, además de realizar lavados secundarios con agua caliente sobre la capa de Celita para la remoción casi total de inulina.

En base a la **Tabla 14**, la ultrafiltración posee el más bajo % de rendimiento para la obtención de inulina y se atribuye a que el tamaño de poro es demasiado pequeño como para filtrar parcialmente inulina y fructooligosacáridos, al cabo de un lapso de tiempo (2-3 horas) la membrana se satura y se tapa evitando que la ultrafiltración se lleve a cabo. La extracción con 80 partes de agua y 20 partes de etanol se tiene también un bajo % de rendimiento de recuperación de inulina debido a que el etanol contribuye con la precipitación parcial de inulina y fructooligosacáridos, por consiguiente una concentración mayor de etanol en el medio disminuiría la cantidad de inulina recuperada e incrementaría el tiempo de realización del método; el empleo de una menor concentración de etanol no es favorable debido a que, con la temperatura de extracción a la que se somete la muestra, este disolvente se volatiliza y se evapora del medio de extracción.

De acuerdo con los datos obtenidos en esta investigación se encontró que la obtención de inulina mediante la implementación de un método de extracción sencillo de inulina es un proceso factible. El producto tiene una alta concentración de inulina, fructooligosacáridos y azúcares fermentables, el cual puede ser utilizado para la producción de un aditivo alimentario o utilizado como un alimento funcional por su propiedad como prebiótico.

5.6 Macro-Extracción con Método de Sistema de Filtraciones con Celita

La **Tabla 15** muestra las concentraciones en base húmeda de los respectivos hidratos de carbono cuantificados en la muestra de cebolla morada (*Allium cepa*) empleando el método de filtración con Celita proceso #2. Esta extracción se caracteriza por que se empleo una cantidad de muestra mayor (5 veces más grande con la cual se determino el método que proporcionaba el mayor porcentaje de recuperación de inulina).

Tabla 15. Concentración de Inulina, Glucosa y Fructosa en Base Húmeda por el método de Sistema de Filtraciones con Celita Proceso #2

REPLICA	INYECCIÓN	CONCENTRACIÓN DE INULINA (mg/100 g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/100 g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN DE FRUCTOSA (mg/100 g DE MUESTRA)
B	1	430.98	467.82	9088.63
	2	438.39	416.88	9258.49
	3	422.48	269.46	9522.89
C	1	429.82	206.51	8600.42
	2	417.43	196.94	9038.72
	3	407.16	409.56	8420.35
Promedio		424.38	327.86	8988.25
Desviación estándar		11.12	117.87	410.96
Coefficiente de Variación		2.61	35.95	4.57

Cuando se desarrolla y experimenta a una escala menor el método propuesto para obtener una cantidad mayor de cebolla morada, se obtuvo un rendimiento de 440.84 mg/100 g de inulina en el producto fresco, por lo que cuando se quintuplica la cantidad de muestra que se somete al método de extracción se obtuvo un rendimiento de 424.38 mg/100 g de inulina en la cebolla morada, lo que representa el 96.62 % de recuperación respecto al método propuesto a menor escala.

5.7 Costos de Extracción

Se considera que la optimización de los métodos básicos a nivel laboratorio presentados en este trabajo puede mejorar para impulsar la obtención de inulina a nivel industrial. En el mismo sentido, el desarrollo y mejoramiento de los procesos para la extracción de fructooligosacáridos y la producción de productos a base de inulina puede permitir el mejoramiento socioeconómico de las regiones, en este caso, donde se lleve a cabo la producción de la cebolla morada (*Allium cepa*).

Los resultados de este estudio permiten concluir que es factible tecnológicamente diseñar un método de procesamiento integral para extraer inulina, obteniendo industrialmente productos ricos en este fructooligosacáridos y mostos fermentecibles para la producción de aditivos alimentarios, además de la fermentación etanólica.

6. Conclusiones

El lote de cebolla con mayor contenido de inulina corresponde al lote #5, éste fue comprado en el municipio de Coacalco. Dicho establecimiento se provee de cebolla morada de la central de abastos con sucursal en La Viga, cultivada la mayor parte en el Estado de Puebla y parte del Estado de Tlaxcala.

El lote #5 de cebolla morada tiene una concentración de fibra dietética de 1.9% base húmeda, en donde la inulina forma parte de la fracción soluble de dicho componente; sin embargo, no existe una relación proporcional entre la concentración de inulina y FDT, ya que un alto contenido de FDT no asegura un alto contenido de inulina.

Por contrato de privacidad, se desconoce la trayectoria comercial específica. Dependiendo del lugar de adquisición del área metropolitana de cebolla morada, esto influye de manera considerable en la concentración de inulina, así como de una extracción.

En cuanto al análisis cuantitativo de inulina y FOS en cebolla morada (*Allium cepa*) las muestras vegetales poseen un contenido promedio de 4,217.14 mg/100 g de muestra base seca, comparando con datos bibliográficos reportándose concentraciones de 2 a 6 % de inulina base seca se concluye como un óptimo porcentaje de recobro. La metodología propuesta es aceptable y viable a pesar de tener una concentración variable de inulina en los lotes estudiados, en base al coeficiente de variación dicha metodología es reproducible.

El método de extracción recomendado para la obtención de inulina es el sistema de filtraciones con Celita debido a que es un método factible en función de la reproducibilidad de la metodología y la practicidad para montar el equipo, además de obtenerse el mayor porcentaje de recobro de inulina.

La ventaja de la metodología propuesta para la extracción de inulina se atribuye a someter mayores cantidades de cebolla morada para un recobro óptimo de dicho prebiótico a nivel laboratorio.

7. Bibliografía

Arnal, J. M. B. Garcia-Fayos, G. Verdu, J. Lora. Ultrafiltration as an alternative membrane technology to obtain safe drinking water from surface water: (10 years of experience on the scope of the AQUAPOT Project). *Desalination*, 248, 34-41. 2009

Behall, K. M. Effect of Soluble Fibers on Plasma Lipids, Glucose Tolerance and Mineral Balance. Carbohydrate Nutrition Laboratory, Department of Agriculture. Beltsville, Maryland. 1990

Blanshard, J. M. V., Mitchell, J. R. Polysaccharides in Food. Editorial Butterworths. 1th Edition, University of Nottingham, pp. 33-45, 1979.

Bowling, T.E. Colonic secretory effect in response to enteral feeding in humans. *Gut* 1994; 35: 1734-41.

Chacón, Perspectivas Agroindustriales Actuales de los Oligosacáridos. *Agronomía Mesoamericana*, 17, 265-286 (2006)

Fennema, Química de los Alimentos, Editorial Acribia, Quinta edición, México, D. F. Volumen 2, pag 207, 262-264, 2008.

Gomez-Ayala, Tellez-Luis, Aprovechamiento integral del Agave americana – Aztlan, Reynosa, Tampico. Centro de Biotecnología Genómica, IPN, 2007.

Helrich, K. (editor), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 15th edition, Published by AOAC, Inc. volume I, pp. 69-83, Arlington, 1990.

Kaur, N. & Gupta, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*. 27, 703-714, 2006.

Lopez, M. D., Navarro M. Ma., Rojas M. F. Molecular properties effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L. *Phytochemistry*. 66, 1476-1484. 2005

López-Molina, D. Molecular properties and prebiotics effect of inulin obtained from artichoke (*Cyanara scolymus* L) *Phytochemistry*, 86, 1476-1484. 2005.

Madrigal y Sangronis; La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57 (4), 387-395, 2007.

Majem L. Prevalence of obesity in Spain. *Med Clin (Barc)* 2006; 125 (12): 460-6.

Markwart, Worms, Begli. Inulin derivatives, process for their preparation and their use. Patent Number 5,502,180. Germany. 1994

Marlett, Analysis of Human Diet Fiber. Department of Nutritional Sciences, University of Wisconsin-Madison. Madison, Wisconsin, 2006.

Marsilio R., Naturale M., Manghi P. Rapid and simple determination of inulin in biological fluids by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *Journal of Chromatography* 744, 241-247. 2000

Mimi Sakinah, A. M., Ismail, A. F., Hassan, Osman. Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes. *Desalination* 239, 317-333. 2009

Miranda R. A. La fibra dietaria en la alimentación. Determinación del contenido de fibra soluble e insoluble en alimentos. Proyecto de investigación 235/88. U. A. E. M. Toluca, Estado de México.

Park, K. J., de Oliveira, R. A. Drying Operational Parameters Influence on Chicory Roots Drying and Inulin Extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 85, 184-192. 2007

Quintín Olascoaga, José. *Dietética: Alimentación de Enfermos*. México. 5, 135-140. 2003

Ramírez, J. A., Gómez-Ayala, R. C. Evaluation of Treatments to Reduce Hardness of Agave americana Core. *Food Technologic and Biotechnologic*, 44, 545-552. 2006

Roberts, D.R. Fat, Fiber, Meat and the Risk of Colorectal Adenomas. *American Journal of Gastroenterology*; 100, 2789–2795. 2004

Ronkart, Sebastian N., Blecker, Christophe S.; Isolation and Identification of inulooligosaccharides resulting from inulinhydrolysis, 604, 81-84. 2007

Schneeman, Barbara O. Gastrointestinal Responses to Dietary Fiber. Department of Nutrition. University of California. Davis, California. 24, 66-69. 1990

Selvendran, Robert R. y Verena, F. V. Chemistry and Properties of Plant Cell Walls. AFRCInstitute of Food Research, Norwich Laboratory. Norwich, United Kingdom. 18, 36-42. 1995

Sherianne M. James. Method for Producing Fat-Free and Low-Fat Viscous Dressing Using Inulin. Patent Number 5,721,004. USA. 1998

Trabs, K., N. Kasprick and T. Henle. Isolation of Reaction Products Resulting from Heat-Induced Degradation of Inulin. *Journal of Food Science*, 27, 166-168. 2009

Van Laere E, A. & VAN DEN ENDE, W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment*. 25, 803-813. 2002

Vidanarachchi, J.K.; Iji, P.A.; Mikkelsen, L.L. Isolation and characterization of water-soluble rebiotic compounds from Australian and New Zealand plants. *Carbohydrate Polymers*. (Australia). 36, 312-315. 2009

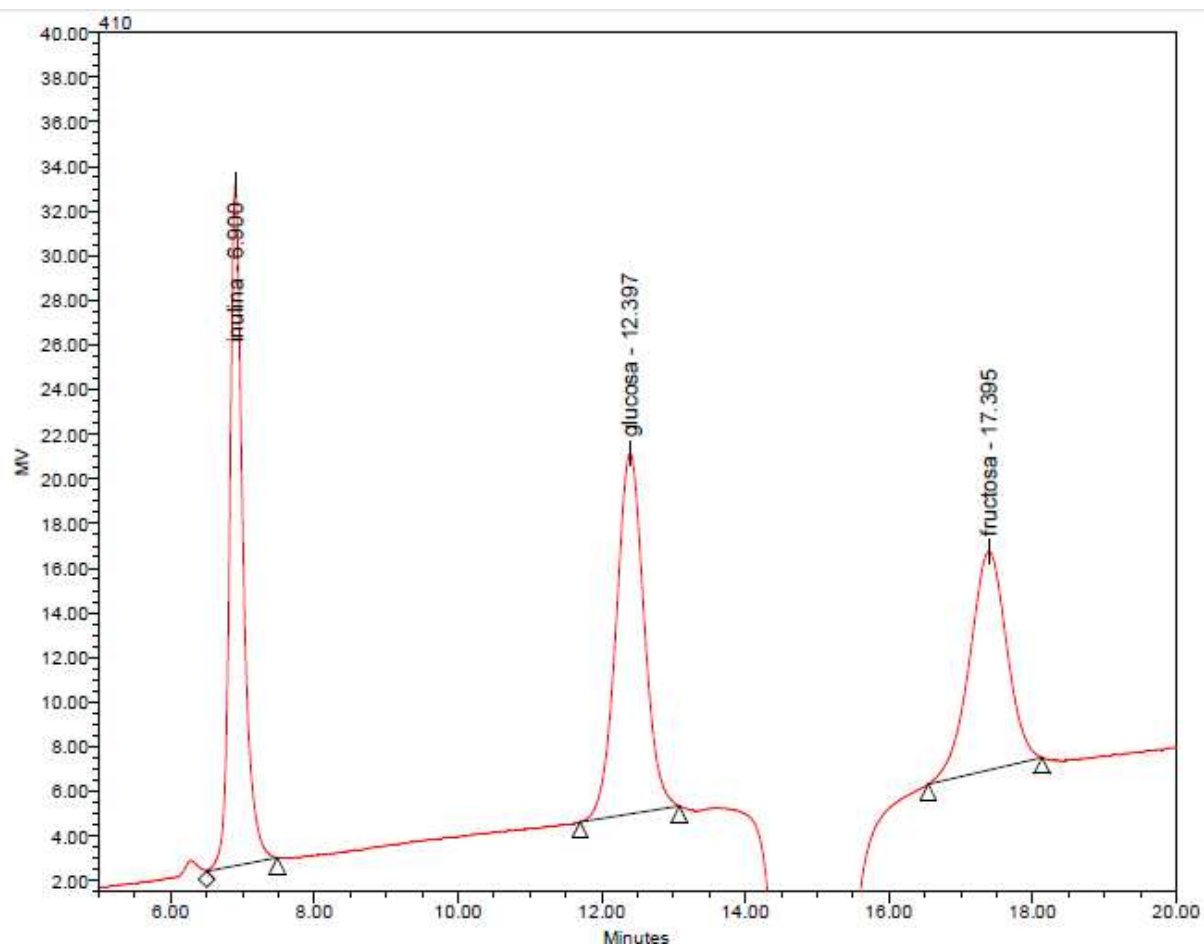
Vela, I. Villafuerte, P. Obtención y Cuantificación de Inulina, Composición Proximal y Contenido de Fibra Dietética en Muestras de Origen Vegetal. 1, 7-20. México, 2009

Voragen, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology* 9, 328-335. 1998

ANEXO A

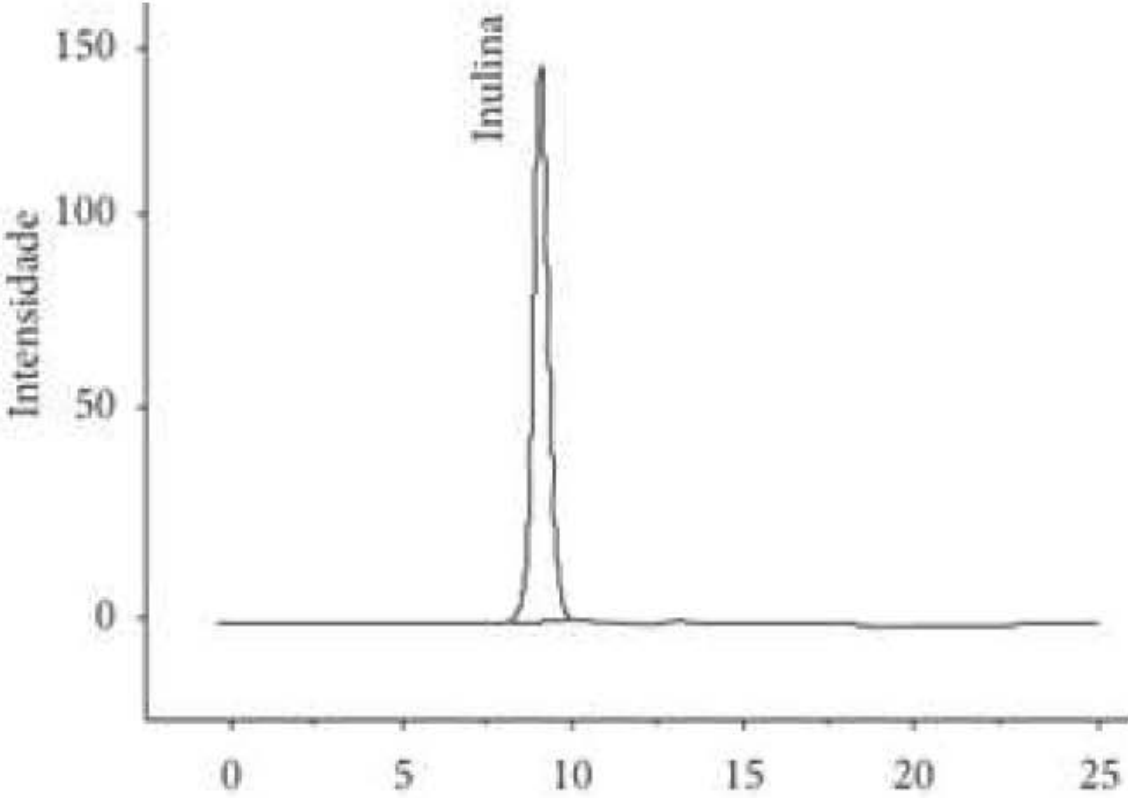
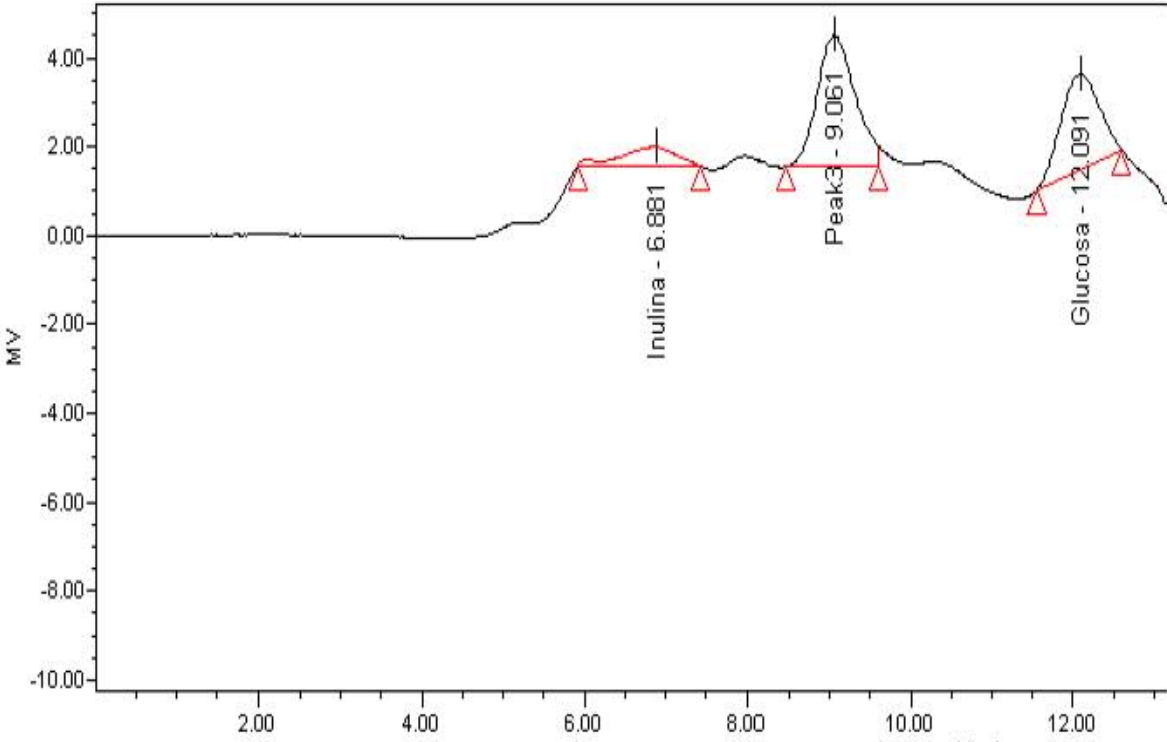
Cromatograma de Estándares

Imágenes de cromatograma tomadas a partir del software de CLAR.



Analito	Tiempo de retención (min)
Inulina	6.900
Glucosa	12.397
Fructosa	17.395

Cromatograma de Cebolla Morada



Muestra	Tiempo de retención (min)	Área (promedio)
---------	---------------------------	-----------------

Cebolla morada (lote 4)	6.881	641363
-------------------------	-------	--------

Nombre de archivo: Informe Tesis
Directorio: C:\Documents and Settings\Ruben Guerrero\Mis documentos
Plantilla: C:\Documents and Settings\Ruben Guerrero\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Asunto:
Autor: Valued Acer Customer
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 29/07/2010 14:47:00
Cambio número: 127
Guardado el: 27/09/2011 22:42:00
Guardado por: Valued Acer Customer
Tiempo de edición: 3,850 minutos
Impreso el: 27/09/2011 22:58:00
Última impresión completa
Número de páginas: 73
Número de palabras: 14,443 (aprox.)
Número de caracteres: 79,438 (aprox.)