

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**  
**FACULTAD DE TECNOLOGIA**  
**QUIMICA INDUSTRIAL**



**EXTRACCION DE BETA-GLUCANO DEL HONGO (*Suillus Luteus*  
*Boletus*), POLISACARIDO CON POTENCIAL USO EN ALIMENTOS**

**Proyecto de grado para optar al título de Licenciatura en Química Industrial**

**Por: ANAHI INGRITH GONZALES ZELAYA**  
**GIOVANA MAMANI LIMACHI**

**Tutor: PHD. ROMULO RENE GEMIO SIÑANI**

**Cotutora: LIC. ELIANA PATRICIA DUCHEN URIARTE**

**La Paz-Bolivia**

## INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
3. JUSTIFICACION .....	4
4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
4.1.1. Objetivo general .....	5
4.1.2. Objetivo específico.....	5
5. MARCO TEORICO.....	6
5.1. Alimentos funcionales .....	6
5.1.1. Alimentos funcionales de origen natural.....	7
5.1.2. Alimentos funcionales a los que se ha añadido un componente externo. ....	7
5.1.3. Alimentos funcionales a los que se ha reducido o eliminado un componente.....	7
5.2. Hongos como alimentos funcionales .....	7
5.3. Hongos en Bolivia.....	9
5.4. Hongo <i>Suillus luteus boletus</i> (Callampas).....	10
5.4.1. Morfología.....	11
5.4.2. Composición nutricional .....	12
5.4.3. Principios activos del <i>Suillus luteus</i> .....	12
a. Polisacáridos.....	12

5.5.	Beta-glucano .....	14
5.5.1.	Estructura química de los glucanos .....	14
5.6.	Beta-glucano y el sistema inmunológico .....	15
5.6.1.	El $\beta$ -glucano y sus propiedades anticancerígenas .....	16
5.6.2.	El $\beta$ -glucano y su efecto sobre el colesterol .....	16
5.6.3.	El $\beta$ -glucano y su efecto en la salud respiratoria.....	17
5.6.4.	El $\beta$ -glucano y su efecto en la diabetes .....	17
6.	METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION .....	18
6.1.	Recolección del hongo .....	18
6.2.	Parte experimental .....	18
6.2.1.	Equipos.....	18
6.2.2.	Reactivos .....	19
6.2.3.	Materiales .....	19
6.3.	Metodología .....	20
6.3.1.	Toma de muestra .....	20
6.3.2.	Pretratamiento del hongo .....	21
6.3.3.	Extracción Soxhlet .....	22
6.3.4.	Extracción acida - básica.....	25
a.	Precipitación del almidón.....	25
b.	Precipitación de proteínas .....	26

c.	Precipitación del $\beta$ – glucano .....	27
7.	CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACION DE B-GLUCANOS .....	30
7.1.1.	Caracterización cualitativa como azúcar reductor .....	30
a.	Formación de espejo.....	30
b.	Reducción del licor de Fehling.....	30
7.1.2.	Caracterización cualitativa como glucosa .....	31
a.	Reacción de Moore.....	31
b.	Reacción de Brown .....	31
7.2.	Preparación de la Curva de Calibración.....	32
7.2.1.	Método fenol – sulfúrico .....	33
7.2.2.	Preparación de la Muestra .....	34
7.3.	Cuantificación del beta-glucano .....	35
7.3.1.	Identificación por uv-visible .....	35
7.3.2.	Identificación infrarroja.....	36
8.	APLICACIÓN DEL BETA-GLUCANO EXTRAÍDO.....	38
8.1.	Aplicación de beta-glucano en productos lácteos.....	38
8.2.	Ingesta de beta-glucano.....	38
8.3.	Proceso tecnológico de la leche .....	39
8.3.1.	Recepción de la leche cruda .....	39
8.3.2.	Termización.....	39

8.3.3.	Filtración .....	39
8.4.	Proceso tecnológico de la elaboración de yogur.....	40
8.4.1.	Estandarización .....	40
8.4.2.	Aditivos usados en la elaboración.....	40
a.	Agentes estabilizantes. ....	40
b.	Agentes edulcorantes.....	40
c.	Agentes conservantes .....	40
8.4.3.	Adición de nutrientes .....	41
8.4.4.	Tratamiento térmico .....	41
8.4.5.	Incubación .....	41
8.4.6.	Ruptura y enfriamiento del coagulo.....	41
8.4.7.	Inclusión de beta-glucanos en yogur.....	42
8.4.8.	Envasado y etiquetado.....	42
8.4.9.	Almacenamiento.....	42
9.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	44
9.1.	Contenido de humedad .....	44
9.2.	Cuantificación de la extracción de beta-glucanos.....	44
9.2.1.	Extracción soxhlet.....	44
9.2.2.	Extracción acuosa-ácida-básica.....	45
9.3.	Comparación de beta-glucano extraído a partir de los dos métodos .....	47

9.4.	Cuantificación de beta-glucano.....	48
9.4.1.	Curva de calibración para el espectro uv-visible .....	48
9.5.	Concentración de beta-glucano.....	49
9.5.1.	Cantidad de beta-glucano .....	50
9.5.2.	Porcentaje de beta – glucano obtenido.....	50
9.5.3.	Rendimiento .....	51
9.6.	Análisis estructural del $\beta$ -glucano.....	52
9.7.	Evaluación de las propiedades fisicoquímicas del producto de aplicación .....	53
9.8.	Trazabilidad del producto final.....	54
10.	CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES .....	55
10.1.	Conclusiones.....	55
10.2.	Recomendaciones .....	57
	BIBLIOGRAFÍA.....	58
	ANEXOS.....	64
	Anexo A: NB 33013 - Productos Lácteos – leche cruda y fresca.....	64
	Anexo B: NB/NA 0078 - Leches fermentadas.....	66
	Anexo C: NB 707 - Leche y productos lácteos – Muestreo.....	69
	Anexo D: NB 887 - Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos.....	70

Anexo E: ETD 33036 - Productos lácteos – Leches fermentadas con adición de nutrientes.....	71
Anexo F: NB 22000 - Sistema de gestión de la inocuidad de alimentos .....	72
Anexo G: NB 855 - Principios generales de higiene de los alimentos .....	74
Anexo H: NB 41001 – Envases y Embalajes.....	76
Anexo I: NB 314004 – Etiquetado nutricional .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de los hongos comestibles .....	8
Tabla 2. Ácidos presentes en las proteínas y lípidos de los hongos comestibles.....	8
Tabla 3. Fibras y vitaminas presentes en los hongos comestibles .....	8
Tabla 4. Distribución de la flora en Bolivia.....	9
Tabla 5. Ubicación departamental del hongo.....	10
Tabla 6. Composición nutricional del hongo <b>Suillus luteus</b> por cada 100g de muestra seca	12
Tabla 7: Optimización de la extracción del hongo para determinar los mejores parámetros ..	24
Tabla 8. Principios activos del hongo .....	28
Tabla 9. Especificaciones organolépticas .....	28
Tabla 10. Ingesta de beta-glucanos por persona en mg/día .....	38
Tabla 11. Porcentaje de los beta-glucanos obtenidos a partir de los extractos evaluados .....	44
Tabla 12. Porcentaje de composición activa obtenida a partir del hongo .....	46
Tabla 13. Porcentaje de beta-glucano extraído .....	47
Tabla 14. Curva de calibración de estándares .....	48
Tabla 15 Concentración de beta-glucano como azúcar reductor .....	49

Tabla 16. Comparación de polisacáridos extraídos del hongo, raíces de dalia, penca de tuna	51
Tabla 17. Características físicoquímicos del yogur sin beta-glucano .....	53
Tabla 18. Evaluación de las características físicoquímicos del yogur con beta-glucano.....	53
Tabla 19. Seguimiento de la trazabilidad del producto terminado.....	54
Tabla 20. Comparación de los valores físicoquímicos bajo norma y obtenidos .....	54
Tabla 21. Requisitos Físicoquímicos aceptables de la leche.....	64
Tabla 22. Requisitos de composición.....	65
Tabla 23. Requisitos microbiológicos realizados a la leche cruda y fresca .....	65
Tabla 24. Requisitos específicos de las leches fermentadas .....	66
Tabla 25. Requisitos físicoquímicos de la leche fermentada .....	67
Tabla 26. Cantidad de microorganismos específicos .....	68
Tabla 27. Plan de muestreo simple para inspección rigurosa de la leche cruda y fresca .....	69
Tabla 28. Principios adición de nutrientes esenciales a los alimentos .....	70
Tabla 29. Requisitos físicoquímicos con la adición de nutrientes .....	71
Tabla 30. Requisitos microbiológicos con la adición de nutrientes.....	71
Tabla 31. HACCP del CODEX y las etapas de aplicación y cláusulas de la NB 22000 .....	72
Tabla 32. Manual de normas de calidad de envase y empaque .....	76
Tabla 33. Contenido nutricional de etiquetas presentación vertical .....	78
Tabla 34. Contenido nutricional de etiquetas presentación horizontal .....	79

## **ÍNDICE DE GRAFICAS**

Grafica 1. Masa de beta-glucano en los extractos evaluados.....	45
Grafica 2. Masa de la composición activa extraída del hongo.....	46

Grafica 3. Comparación porcentual de beta-glucano .....	47
Grafica 4. Curva de calibración del método ácido sulfúrico uv-visible.....	48
Grafica 5. Concentración de beta-glucanos en la curva de calibración uv-visible .....	49

## ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Mercado Rodríguez - La Paz.....	18
Fotografía 2. . Hongos libres de impurezas.....	20
Fotografía 3. Deshidratación del hongo .....	21
Fotografía 4. Hongo deshidratado.....	21
Fotografía 5. Extracción Soxhlet.....	22
Fotografía 6. Extracción Soxhlet.....	23
Fotografía 7. Filtración al vacío para la separación del sobrenadante y las proteínas .....	23
Fotografía 8. Concentración de la muestra y recuperación del solvente.....	24
Fotografía 9. Extracto de beta- glucano .....	24
Fotografía 10. Agitación constante de la muestra en agua destilada .....	26
Fotografía 11. Almidón extraído del hongo .....	26
Fotografía 12. Proteínas presentes en el hongo.....	27
Fotografía 13. Precipitación de beta-glucano.....	27
Fotografía 14. Extracción de proteínas, almidón y beta-glucano.....	28
Fotografía 15. Reducción del nitrato de plata amoniacal, formación de espejo .....	30
Fotografía 16. Reducción del licor de fehling.....	31
Fotografía 17. Acción de los álcalis diluidos.....	31
Fotografía 18. Reducción del reactivo Brown .....	32

Fotografía 19. Matracas aforados con muestra patrón .....	32
Fotografía 20. Agitación de las soluciones estándares.....	33
Fotografía 21. Tubos estándares para la realización de la curva.....	33
Fotografía 22. Muestras de hongo para su cuantificación.....	34
Fotografía 23. Barrido del tercer patrón, cuya longitud de onda es 486 nm. ....	35
Fotografía 24. Espectrómetro visible-uv BIOCHROM de barrido-Libra .....	36
Fotografía 25. Espectrómetro visible-uv BIOCHROM de barrido-Libra .....	36
Fotografía 26. Preparación de la muestra para la pronta lectura en el IR .....	37
Fotografía 27. beta - glucano extraido .....	52

### **ÍNDICE DE FLUJOGRAMA**

Flujograma 1. Recolección del hongo.....	20
Flujograma 2. Pre-tratamiento del Hongo.....	22
Flujograma 3. Extracción soxhlet y concentración de la muestra.....	25
Flujograma 4. Etapas del proceso de extracción acuosa-básica-ácida. ....	29
Flujograma 5. Preparación de la muestra por el método fenol-sulfúrico por duplicado .....	35
Flujograma 6. Proceso tecnológico de la leche .....	39
Flujograma 7. Proceso yogur bebible.....	43
Flujograma 8. Balance de masa .....	44
Flujograma 9. Secuencia lógica para la aplicación del sistema de HACCP .....	74
Flujograma 10. Ejemplo de una secuencia de decisiones para identificar los PCC.....	75

*“He peleado la buena batalla, he acabado la carrera, he guardado la fe. Por lo demás, me está reservada la corona de justicia, la cual me dará el Señor, Juez justo, en aquel día; y no sólo a mí, sino también a todos los que han demostrado amar su aparecimiento.”*

*2 Timoteo 4:7 - 8*

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco a DIOS por darme la vida y guiar, mis pasos día a día,  
JEHOVÁ es mi luz y mi salvación,*

*Agradezco a mis tutores*

**PHD. ROMULO RENE GEMIO SIÑANI**

**LICENCIADA. ELIANA PATRICIA DUCHEN URIARTE**

*Por sus enseñanzas para desarrollarme profesionalmente y haberme  
brindado, todos sus conocimientos en el desarrollo de este proyecto.*

*Agradezco el apoyo y esfuerzo que me brindaron mis padres por darme  
una carrera para mi futuro y por creer en mí.*

*Agradezco a mi abuela por sus oraciones y cuidados hacia mí, en todo  
momento.*

## RESUMEN

El principal objetivo de este trabajo es la obtención de un polisacárido tipo beta-glucano a partir del *Hongo Suillus Luteus Boletus*, comparando dos procesos de extracción con el fin de establecer cuál de ellos tiene una mejor optimización.

El primer proceso de extracción fue a través del método Soxhlet, con tres relaciones diferentes de etanol-agua, para poder comparar entre ellas la mejor relación para una posterior extracción. El segundo proceso utilizado fue la extracción acuosa – básica – ácida utilizando hidróxido de sodio para la separación del almidón y ácido clorhídrico para la precipitación de proteínas.

Para la caracterización del polisacárido obtenido se realizó diferentes pruebas coloridas como ser una de ellas la prueba de Fehling para clasificarlo como un azúcar reductor. Para su cuantificación se realizó una curva de calibración con el método fenol-sulfúrico para calcular el rendimiento de la extracción y final se utilizó métodos espectrofotométricos como ser uv-visible e infrarrojo.

Finalmente, para su aplicación se formuló un yogurt de característica funcional que permitió la adición del extracto obtenido.

## SUMMARY

The main objective of this work is to obtain a beta-glucan polysaccharid from the *Suillus Luteus Boletus Mushroom*, comparing two extraction processes in order to establish which of them has a better optimization.

The first extraction process was through the Soxhlet method, with three different ethanol-water ratios, to be able to compare between them the best relationship for further extraction. The second process used was aqueous – basic – acid extraction using sodium hydroxide for the separation of starch and hydrochloric acid for protein precipitation.

For the characterization of the obtained polysacchaid, different colorful tests were performed such as being one of them the Fehling test to classify it as a reducing sugar. For its quantification a calibration curve was made with the phenol-sulfuric method to calculate the extraction performance and final spectrophotometric methods such as uv-visible and infrared were used.

Finally for its application was formulated a yogurt of functional characteristic that allowed the addition of the extract obtained.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hace pocos años estudiantes universitarios de la comunidad de Yampara de la carrera de Gestión y desarrollo Rural decidieron realizar un proyecto con el objetivo de lograr la reforestación plantando pinos, aproximadamente al tercer año de haber logrado la reforestación, la comunidad de esta región observo algunos hongos o setas comestibles, que crecían bajo la sombra de estos árboles haciéndolos parte de su dieta cotidiana.

Hoy en día las poblaciones de Tahuapalca (La Paz), Yampara (Chuquisaca) y Mizque (Cochabamba). se dedican a la comercialización y exportación de estos hongos conocidos comúnmente como *Callampa*, aunque su nombre científico es *Suillus luteus boletus*, ignorando de cierta forma los verdaderos beneficios que puede otorgar la industrialización de este hongo.

Es por eso que la idea principal de este proyecto es señalar los beneficios reales del hongo en la salud, con el objetivo principal de la extracción de un polisacárido llamado  $\beta$ -glucano y aplicarlo en la elaboración de un alimento funcional.

## 2. ANTECEDENTES

**Gonzales M. (2015)**, en la monografía titulada “Alimentos funcionales obtenidos a partir de hongos nutraceuticos” de la Universidad Tecnológica de Pereira. Explica que los extractos de hongos, preparaciones o sustancias parcialmente purificadas de hongos medicinales, no pueden ser designados como medicinas o fármacos, pero se pueden considerar como una nueva clase de productos denominados suplementos dietarios u hongos nutraceuticos. Partiendo de la idea de *Smith, et al., 2005*, quien explica que el principio activo de estos hongos puede ser usado en forma de tabletas, cápsulas, extractos líquidos o como aditivo para ciertos alimentos.

**Marrufo y Gomonal (2016)**, en la tesis titulada “Efecto de la poda y limpieza del sotobosque para la producción y calidad del hongo (*Suillus luteus*), en plantaciones de pinos” de la Universidad Nacional de Perú. Señala que, teniendo en cuenta la gran importancia que tiene la producción de este hongo; al contener un gran potencial nutritivo que muy bien puede ser incorporado en la dieta alimentaria de la población local, regional y nacional, además de la exportación a los grandes mercados internacionales en mejora de la situación socioeconómica de los pobladores afincados en la zona rural de ésta provincia.

**Hernández F. (2009)**, en el proyecto de investigación titulado “Producción de beta-glucanos a partir de hongos basidiomicetos” del Instituto Politécnico Nacional de México. Indica que, varios extractos de hongos medicinales han sido estudiados, debido a que contiene modificadores de la respuesta biológica. En la actividad antiviral, antibiótica, antiinflamatoria, hipoglucémica, y actividades hipertensivas. Los  $\beta$ -glucanos obtenidos a partir de hongos, plantas y bacterias son

utilizados industrialmente en diferentes industrias como por ejemplo en las áreas de alimentos, cosmética y medicinal.

**Abia A. (2015)**, en el trabajo de fin de grado titulado “ $\beta$ -glucano: estructura química, fuentes biológicas y efectos inmunomoduladores” de la Facultad de Medicina de Valladolid. Señala que los  $\beta$ -glucano, extraídos de cereales como la avena, tienen propiedades de disminuir; el colesterol y la cantidad de glucosa en la sangre.

**Sucasca J. (2009)**, en su tesis de grado titulada “Identificación y caracterización morfológica de especies nativas de hongos comestibles en humedales y bosques de la provincia Camacho, departamento de La Paz” de la Facultad de Agronomía del Departamento de La Paz. Señala que en Bolivia el conocimiento sobre de la importancia de hongos comestibles, está por debajo de los umbrales de los demás países de América Latina. En el oriente del país existe un potencial natural para muchas especies de hongos comestibles apropiados para la producción.

**Rocabado (2011)**, en la edición trimestral de la revista n° 62 con el título “Bolivia ecológica” señala que los hongos constituyen uno de los grupos de organismos más vitales para el medio ambiente, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica, liberando en la tierra muchos nutrientes inorgánicos, tales como el carbono y el nitrógeno, beneficiando de esta manera a las plantas y a los animales que dependen de estos elementos para vivir.

### 3. JUSTIFICACION

Las investigaciones realizadas en los países orientales, acerca de la eficacia de los hongos en la salud, se deben a que la pared celular externa del hongo, está constituida por: ácidos grasos no saturados,  $\beta$ -glucanos, proteínas, minerales y vitaminas. Los  $\beta$ -glucanos, son polisacáridos formados por enlaces glucosídicos, capaces de ayudar en tratamientos cancerígenos y tumorales.

Como objetivo principal de este proyecto es la comparación de dos métodos diferentes de extracción de  $\beta$ -glucanos a partir del hongo *Suillus luteus boletus*, recolectado de la comunidad indígena andina de Tahuapalca, situado a faldas del Illimani, en el departamento de La Paz en Bolivia.

Como aplicación se pretende incorporar al  $\beta$ -glucano extraído en la formulación de un alimento funcional en este caso el yogurt, verificando que su incorporación no afecte las propiedades fisicoquímicas ni la inocuidad del alimento

Esto mejoraría la exportación y la economía en las regiones andinas que se dedican al cultivo y a la producción de derivados de hongos, al mismo tiempo que se proporciona al consumidor un producto de buena calidad que le aporte los requerimientos nutricionales adecuados.

## 4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 4.1.1. Objetivo general

Extraer el  $\beta$ -glucano a partir del *Hongo (Suillus luteus boletus)*, un polisacárido con potencial uso en los alimentos.

### 4.1.2. Objetivo específico

- Extraer el  $\beta$ -glucano presente en el *hongo*, utilizando el método Soxhlet.
- Extraer el  $\beta$ -glucano presente en el *hongo* mediante una extracción ácida – básica.
- Cuantificar el  $\beta$ -glucano obtenido en los extractos
- Realizar la caracterización funcional del  $\beta$ -glucano utilizando métodos espectrofotométricos (UV. IR).
- Inclusión del  $\beta$ -glucano extraído del hongo en un alimento funcional (caso Yogurt)

## 5. MARCO TEORICO

### 5.1. Alimentos funcionales

En los últimos años la aparición de los alimentos funcionales para mejorar la salud y prevenir enfermedades ha logrado captar no solo la atención de la población, sino que se ha convertido en el objetivo principal de investigación en toda industria alimentaria, en la actualidad la aparición de estos alimentos tiene como objetivo principal mejorar la calidad de vida de la población anciana, mujeres embarazadas y niños en crecimiento.

Hasta ahora no se tiene una definición exacta de los alimentos funcionales sin embargo el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida en Europa (IILSI-EUROPE), indica que “Un alimento puede considerarse funcional si ha demostrado satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de sus efectos nutricionales de manera que es relevante tanto para mejorar el estado de salud y bien estar como para reducir alguno de los factores de riesgo de enfermedades”

Es importante mencionar los diferentes tipos de alimentos funcionales existentes en nuestro país, estos son:

- a. Alimentos funcionales de origen natural.
- b. Alimentos funcionales a los que se añadió un componente externo.
- c. Alimentos funcionales a los que se ha reducido o eliminado un componente.

### **5.1.1. Alimentos funcionales de origen natural.**

Son alimentos tradicionales que contienen propiedades beneficiosas por sí mismas, sin necesidad de que se realice ninguna modificación en su estructura química, como son las frutas, verduras, la leche, hongos comestibles.

### **5.1.2. Alimentos funcionales a los que se ha añadido un componente externo.**

Son alimentos o bebidas que fueron modificados en su formulación agregando componentes macronutrientes como ser: fibra, omega 3, calcio, etc. Ese concepto incluye a los alimentos medicinales, que incorpora sustancias biológicamente activas extraídas de un alimento funcional de origen natural que es saludable para el organismo humano, como ser beta-glucano, antioxidantes y prebióticos, entre otros.

### **5.1.3. Alimentos funcionales a los que se ha reducido o eliminado un componente.**

Son alimentos o bebidas a los que se le ha sustraído un componente que puede afectar la salud de aquellas personas intolerantes a ciertos componentes de un alimento funcional, estos pueden ser: lácteos descremados, reducidos en sodio, sin azúcar, sin lactosa, etc.

## **5.2. Hongos como alimentos funcionales**

Estudios científicos han podido corroboran las propiedades medicinales de los compuestos activos de los hongos, y gracias al avance de la química orgánica analítica, y tecnológica, se ha podido aislarlos y purificarlos, de los cuerpos fructíferos y micelio de hongos comestibles y medicinales que pueden ayudar a la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer, diabetes, obesidad, colesterol, etc.

Tabla 1.  
Composición nutricional de los hongos comestibles

Producto	Materia seca g/kg	Valor energético kcal	Calorías Kcal	Proteínas g/kg	Aminoácidos Esenciales g/kg	Lípidos g/kg	Hidratos de carbono g/kg	Polisacáridos g/kg	Minerales g/kg
Fresco	80 a 104	350 a 400	15 a 45	2 a 2.5	----	----	----	----	----
Seco	----	----	105 a 320	200 a 250	39.7 a 86.8	20 a 30	28.9 y 39.2	50 a 100	80 a 120

Fuente: Ríos y Días, Melgarejo E. 2015

Tabla 2.  
Ácidos presentes en las proteínas y lípidos de los hongos comestibles

Producto	Ácido Glutámico g/kg	Ácidos Oleico %	Ácidos Palmítico %	Ácidos Linoleico %
Seco	93.6 a 230	20 a 50	10 a 15	25 a 60

Fuente: Ríos y Días, Melgarejo E. 2015

Tabla 3.  
Fibras y vitaminas presentes en los hongos comestibles

Producto	Fibras solubles g/kg	Fibras insolubles g/kg	Vitaminas mg/kg		
			C	E	D
Seco	40 a 90	220 a 300	150 a 300	0.5 a 3	3 a 7

Fuente: Ríos y Días, Melgarejo E. 2015

### 5.3. Hongos en Bolivia

Bolivia está situada entre los ocho países con mayor riqueza biológica del planeta, la diversidad de flora alcanza los 130 y 6542 metros sobre el nivel del mar, lo que hace posible la existencia de bosques que albergan una diversidad de plantas entre ellos al reino fungí.

Tabla 4.  
*Distribución de la flora en Bolivia*

<b>Especies</b>	<b>%</b>	<b>Cantidad</b>
Briofitas	6 %	1 500
Pteridofitas	5%	1 200
Espermatofitas	85%	20 000
Hongos	4%	1 000
<b>TOTAL DE ESPECIES</b>	<b>100%</b>	<b>23 700</b>

Fuente: Los recursos naturales de Bolivia (CEDIB, 2005)

Bolivia cuenta con al menos 24 especies de hongos útiles, donde el 54% son comestibles, 29 % medicinales, y el 17% tienen propiedades de absorber y degradar elementos contaminantes para la naturaleza (**Melgarejo E. 2015**).

Entre los hongos comestibles con propiedades medicinales se encuentra el *Suillus luteus* boletus más conocidos tradicionalmente con el nombre de Callampas o K'allampus según al departamento en el que se cosecha o produce.

Tabla 5.  
*Ubicación departamental del hongo*

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Departamento</b>	<b>Municipio o Localidad</b>
<i>Suillus Luteus L.</i>	Callampas	La Paz	Los Andes
	K'allampus	Chuquisaca	Yampara
	Callampas	Cochabamba	Mizque

Fuente: (Melgarejo E. 2015)

#### **5.4. Hongo *Suillus luteus boletus* (Callampas)**

En el altiplano andino de Bolivia se encuentran plantaciones de bosques de pino que favorecen al crecimiento del hongo silvestre, en épocas de otoño e invierno por los meses de noviembre a febrero, este crecimiento está relacionado principalmente con la humedad, la sombra y el cuidado de cada pino. Comunidades enteras se dedican a la cosecha y comercialización en ferias dominicales en los departamentos de La Paz, Chuquisaca y Cochabamba, que son los principales exportadores de hongos silvestres comestibles, la importancia de este hongo radica en sus cualidades nutricionales y medicinales las cuales no son aprovechadas en nuestro país, debido a esto el 95% de hongos cosechados se vende a Perú y solo el 5% es consumido en el mercado interno.

En el año 2017 se produjo alrededor de 35 toneladas de hongos y en el año 2018 se alcanzaba un total de 65 toneladas, la producción actual alcanzo aproximadamente entre 15 a 20 toneladas de productos frescos y 7 a 8 toneladas de producto deshidratado. El precio de producto deshidratado por arroba cuesta entre 200 a 230 bolivianos y el kilo se comercializa aproximadamente a 20 bolivianos, cuyo precio de exportación llega a unos 75 dólares.

#### 5.4.1. Morfología

Morfológicamente estos hongos son de color amarillo crecen entrelazados entre las raíces de árboles de pinos, estas raíces le proporcionan, carbohidratos, azúcares y sustancias ácidas que beneficia al crecimiento y desarrollo del hongo a su vez el hongo proporciona al pino las proteínas y minerales necesarios para su oxigenación.



Figura 1. Hongo *Suillus luteus*, fuente Diario Opinión

Estos hongos se caracterizan por presentar un sombrero convexo que llega a medir entre 5 a 15 cm de diámetro con una superficie viscosa, de color café cuando es joven y empieza a palidecer cuando alcanza la edad madura, el tallo es firme de color amarillo pálido o blanquecino y alcanza a medir de 3 a 13 cm de alto con un diámetro de 10 a 15 mm, la carne es un sabor dulce y olor agradable (Decofrut 1996, Sucasaca 2009).

### 5.4.2. Composición nutricional

El hongo silvestre, está compuesto principalmente por agua aproximadamente en un 80 a 90 % en producto fresco, proteínas, fibras, carbohidratos, minerales como hierro, calcio, fosforo, potasio, selenio y vitaminas del complejo B2, B3, C y D. el porcentaje de cada uno se detalla a continuación en la siguiente tabla.

Tabla 6.

Composición nutricional del hongo *Suillus luteus* por cada 100g de muestra seca

<b>Proteína %</b>	<b>Grasa %</b>	<b>Carbohidratos totales %</b>	<b>Humedad %</b>	<b>Ceniza %</b>	<b>Fibra cruda %</b>
23.57 a 25.83	7.74 a 9.58	47.56 a 50.38	13.22 a 11.61	4.95 a 4.43	20.41 a 16.19

Fuente: Escuela Académico Profesional de Nutrición, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, 2019

### 5.4.3. Principios activos del *Suillus luteus*

En el hongo *Suillus luteus*, se pueden mencionar dos sustancias responsables de sus principales efectos sobre la salud: los polisacáridos del tipo  $\beta$ -glucanos y los ácidos nucleicos.

#### a. Polisacáridos

Los polisacáridos que son compuestos que presentan mayor actividad antitumoral y antiviral, los beneficios que aporta en la salud son:

- Controla el incremento de la glucosa sanguínea o en la secreción de la insulina, debido a la formación de un gel viscoso en el intestino, lo que permite disminuir la absorción de la glucosa liberada.

- Aproximadamente aportan pequeñas cantidades de energía entre un rango de 0 – 3 kcal/g de sustituto de azúcar.
- Mejora la flora intestinal, dando como resultado un medio ácido que permite el crecimiento de bacterias saludables para el cuerpo.
- Estimula a la absorción intestinal de minerales como el magnesio, calcio, y hierro.

Estos polisacáridos son: quitina,  $\beta$ -glucano, compuestos fenólicos, complejos polisacáridos-proteicos, que se encuentran en la pared celular de los hongos. Estos polisacáridos pueden ser utilizados en el tratamiento de agua, en la industria alimentaria, medicina, biotecnología, agricultura, cosmética, textiles, alimentos nutraceuticos y en la industria papelera.

También son una gran fuente de minerales como: el potasio ya que ayuda a eliminar líquidos corporales al aumentar la micción, el fósforo que resulta tan necesario en la formación de los dientes, los huesos y ayuda a mantener el organismo más tranquilo evitando el estrés y la mejora de memoria, el selenio que ayuda a descontaminar el organismo de metales pesados por lo que resulta adecuado en fumadores y fumadores pasivos.

Entre las vitaminas presentes en los hongos está: la vitamina B2 que interviene en la transformación de alimentos en energía, interviene en la respiración celular, mejora el sistema ocular, vitamina B3 mejora el sistema circulatorio, mantiene la piel sana, estabiliza la glucosa en la sangre, estabiliza el sistema nervioso, vitamina C que ayuda al crecimiento y reparación de tejidos, tendones y los vasos sanguíneos, repara y mantiene el cartílago de los huesos y dientes, sin olvidar sus propiedades antioxidantes, vitamina D ayuda al sistema nervioso para transmitir

mensajes entre el cerebro y cada parte del cuerpo, combate a virus y bacterias que invaden el cuerpo, combate la osteoporosis.

## 5.5. Beta-glucano

Los  $\beta$ -glucanos son azúcares indigeribles por el organismo, aproximadamente el 50% en masa del hongo corresponde a los  $\beta$ -glucanos junto a la quitina, sin embargo, el contenido puede estar influenciado por muchos factores, como el tipo de especie, las condiciones de cultivo de hongos, el grado de madurez del cuerpo fructífero, el contenido total de fibra dietética, entre otros, este porcentaje puede mejorar con la pérdida de agua que sufre el hongo durante el proceso térmico de deshidratación

### 5.5.1. Estructura química de los glucanos

Los  $\beta$ -glucanos son moléculas (específicamente polisacáridos) formados por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucósidos “beta” formando anillos de seis caras conectados unos a otros, estos polisacáridos forman cadenas lineales en diferentes posiciones estructurales, variando así su solubilidad, viscosidad, peso molecular y configuraciones tridimensionales.

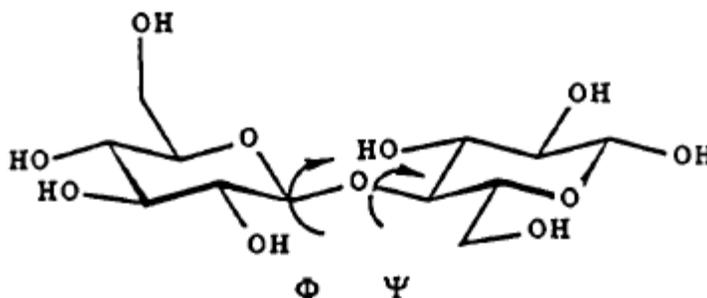


Figura 2. Estructura general de (1-3)- beta-glucano

La estructura más común presentes en el tallo de los hongos es el  $\beta$ -1,3-glucano,  $\beta$ -1,6-glucano presente en las ramificaciones de hongos, insolubles en agua con mayor actividad biológica en el sistema inmune.

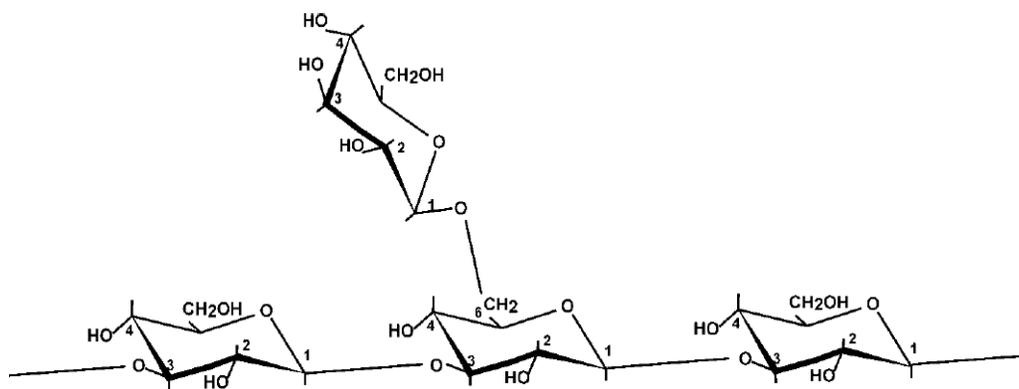


Figura 3. Estructura química de beta-1,3-glucano y beta-1,6-glucano

Las propiedades fisicoquímicas como propiedades biológicas de los  $\beta$ -glucanos dependen de su estructura, longitud de sus cadenas, peso molecular, y su organización tridimensional.

### 5.6. Beta-glucano y el sistema inmunológico

El efecto más significativo de los  $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,6-glucanos puede ser descrito como refuerzos inmunes, que, estimulan los macrófagos y neutrófilos. Estas células forman parte de la primera línea de defensa del sistema inmunológico, que protegen al cuerpo de la constante exposición a enfermedades causadas por bacterias, virus y otros patógenos.

Los  $\beta$ -glucanos permiten la mejora de las funciones de los macrófagos que digieren el piquete en fragmentos más pequeños y lo liberan, estos fragmentos se unen a los neutrófilos que tienen

receptores específicos para la macro-molécula a través del receptor complemento preparándolos para la actividad inmunológica.

El  $\beta$ -glucano que pasa a través del estómago, para su absorción en las placas de Payer que son regiones especiales en el intestino delgado mejora la protección contra sustancias ingeridas, ácido estomacal y enzimas gástricas.

#### **5.6.1. El $\beta$ -glucano y sus propiedades anticancerígenas**

La investigación de la Facultad de medicina en Estados Unidos demuestra que las células cancerígenas a menudo se pueden normalizar con mayor facilidad y eficacia, cuando están acompañados de tratamientos terapéuticos utilizando el  $\beta$ -1,3-1,6-glucano, estos estudios indican que un consumo moderado de manera regular de  $\beta$ -glucanos, mejora las células inmunes blancas de macrófagos para reconocer y responder apropiadamente a las células cancerosas potencialmente dañino y su eliminación temprana.

#### **5.6.2. El $\beta$ -glucano y su efecto sobre el colesterol**

El contenido de fibra en el  $\beta$ -glucano, tiene como propiedad principal disminuir el contenido de colesterol que pueden ser acumulados en el corazón y los tubos sanguíneos, aumentando la viscosidad en el intestino delgado para la eliminación de ácidos biliares. Números estudios realizados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria señalan que el consumo mínimo de 3g/día de  $\beta$ -glucano de forma regular, como parte de una dieta regular reducen de gran manera los peligros de sufrir un ataque cardiovascular.

### **5.6.3. El $\beta$ -glucano y su efecto en la salud respiratoria**

Un estudio novedoso e para combatir las enfermedades pulmonares crónicas, como el asma y alergias, es el uso de  $\beta$ -glucanos como suplemento alimenticio en una dosis de 1ml/5kg de peso por tres meses acompañado de una concentración igual de vitamina C en niños de 1 a 12 años, y una dosis entre 3 a 5 mg/día en adultos.

### **5.6.4. El $\beta$ -glucano y su efecto en la diabetes**

Estudios realizados por el departamento de farmacología y fisiología de la Universidad Federal de Lavras en Brasil, comprobaron la efectividad de los  $\beta$ -glucanos, como un tratamiento opcional para prevenir y reducir los efectos de la diabetes, debido a que genera una capa gelatinosa en el intestino delgado que reduce la absorción de carbohidratos disminuyendo el índice de vació gástrico, previendo así la absorción de glucosa y reduciendo los niveles de la glucemia absorbida por el intestino, el estudio reveló que el consumo diario de 6g de  $\beta$ -glucano reduce el 46 % de la glucemia y regula los niveles de insulina en la sangre.

## 6. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

### 6.1. Recolección del hongo

El hongo fue recolectado de los cerros de la comunidad indígena Tahuapalca, ubicado a faldas de la cordillera de los Andes (Illimani), y transportada al mercado Rodríguez del departamento de la Paz para su comercialización.



*Fotografía 1. Mercado Rodríguez - La Paz*

### 6.2. Parte experimental

#### 6.2.1. Equipos

- Horno mufla
- Extractor Soxhlet
- Rota – vapor
- Espectrómetro infrarrojo (IR)
- Espectrómetro ultravioleta (uv-visible)

### 6.2.2. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se usaron sin purificación previa, a menos que se indique lo contrario. Agua destilada

- Etanol (95 % de pureza)
- Hidróxido de sodio (99% de pureza)
- Ácido clorhídrico (solución 2M)
- 2-propanol (95% de pureza)
- Ácido sulfúrico (95,5% de pureza)
- Fenol al 80%
- Licor de Fehling
- Nitrato de plata
- Amoníaco
- Hidróxido de potasio (99% de pureza)
- Reactivo de Benedict

### 6.2.3. Materiales

- Tubos de ensayo
- Tubos para centrifugadora de 50 ml
- Matraces aforados
- Vaso de precipitado
- Pipetas graduadas
- Agitador y calentador magnético
- Cajas Petri

### 6.3. Metodología

#### 6.3.1. Toma de muestra

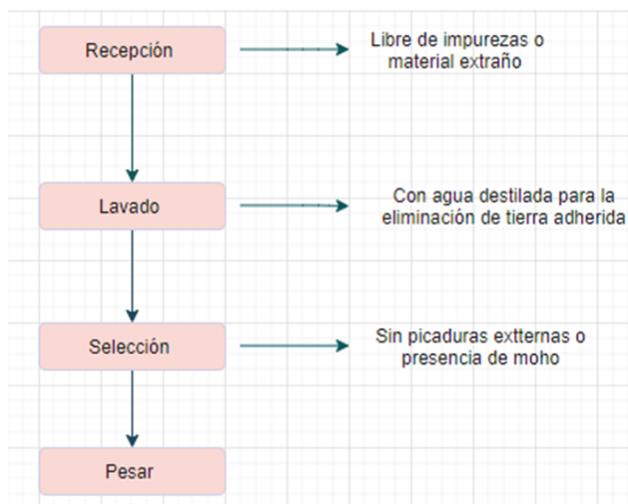
El muestreo para la aceptación de hongos se basa en la combinación del tamaño de la muestra a emplear y los criterios de aceptación según la norma boliviana NB/ISO 2859-1 (Procedimientos de muestreo para inspección por atributo), bajo los siguientes parámetros:

- Libres de impurezas como pastos, piedras, tierra.
- Libres de material extraño como metales, arcilla.
- Sin presencia de moho o picaduras externas.



*Fotografía 2. . Hongos libres de impurezas*

*Flujograma 1. Recolección del hongo*



### 6.3.2. Pretratamiento del hongo

En principio se estudió el contenido de humedad del hongo, para ello se pesó el hongo seco, para su deshidratación en una estufa a 50°C hasta que la masa permaneciera constante.



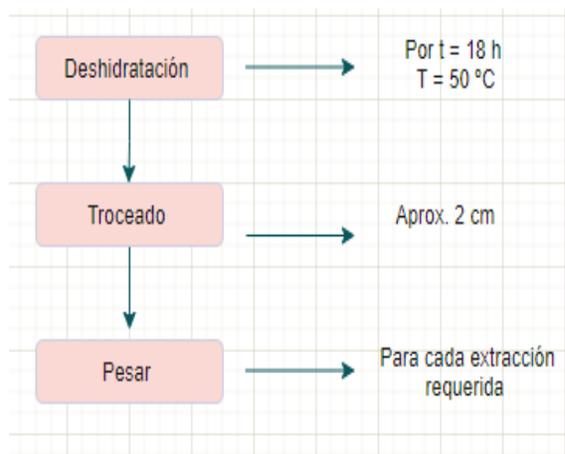
*Fotografía 3. Deshidratación del hongo*

Después de la deshidratación se realizamos el troceado del hongo, finalmente se pesó las masas experimentales para cada extracción.



*Fotografía 4. Hongo deshidratado*

*Flujograma 2. Pre-tratamiento del Hongo.*



### 6.3.3. Extracción Soxhlet

Se pesan alrededor de 400 g de hongo en trozos pequeños dentro de un cartucho de papel filtro, en un balón de 500 ml se prepararon tres diferentes relaciones de alcohol – agua 70:30, 50:50, 30:70, se calentó hasta alcanzar una temperatura de 80°C por tiempo aproximado de 2 horas.



*Fotografía 5. Extracción Soxhlet*

Para la eliminación de proteínas se utilizó 2 – propanol, manteniendo en reposo por 12 horas a temperatura ambiente



*Fotografía 6. Extracción Soxhlet*

El extracto obtenido con dos fases se filtró al vacío, emplea un embudo Buhner y papel filtro cualitativo de 90 mm, este proceso se llevó acabo con la ayuda de una bomba al vacío.



*Fotografía 7. Filtración al vacío para la separación del sobrenadante y las proteínas*

La concentración del extracto se lo realizó en la rota – vapor a temperatura de 80 °C por un tiempo aproximado de 30 minutos, también se logró recuperar el solvente.



Fotografía 8. Concentración de la muestra y recuperación del solvente

El extracto obtenido se centrifuga durante 20 minutos para separar el  $\beta$  – glucano



Fotografía 9. Extracto de beta- glucano

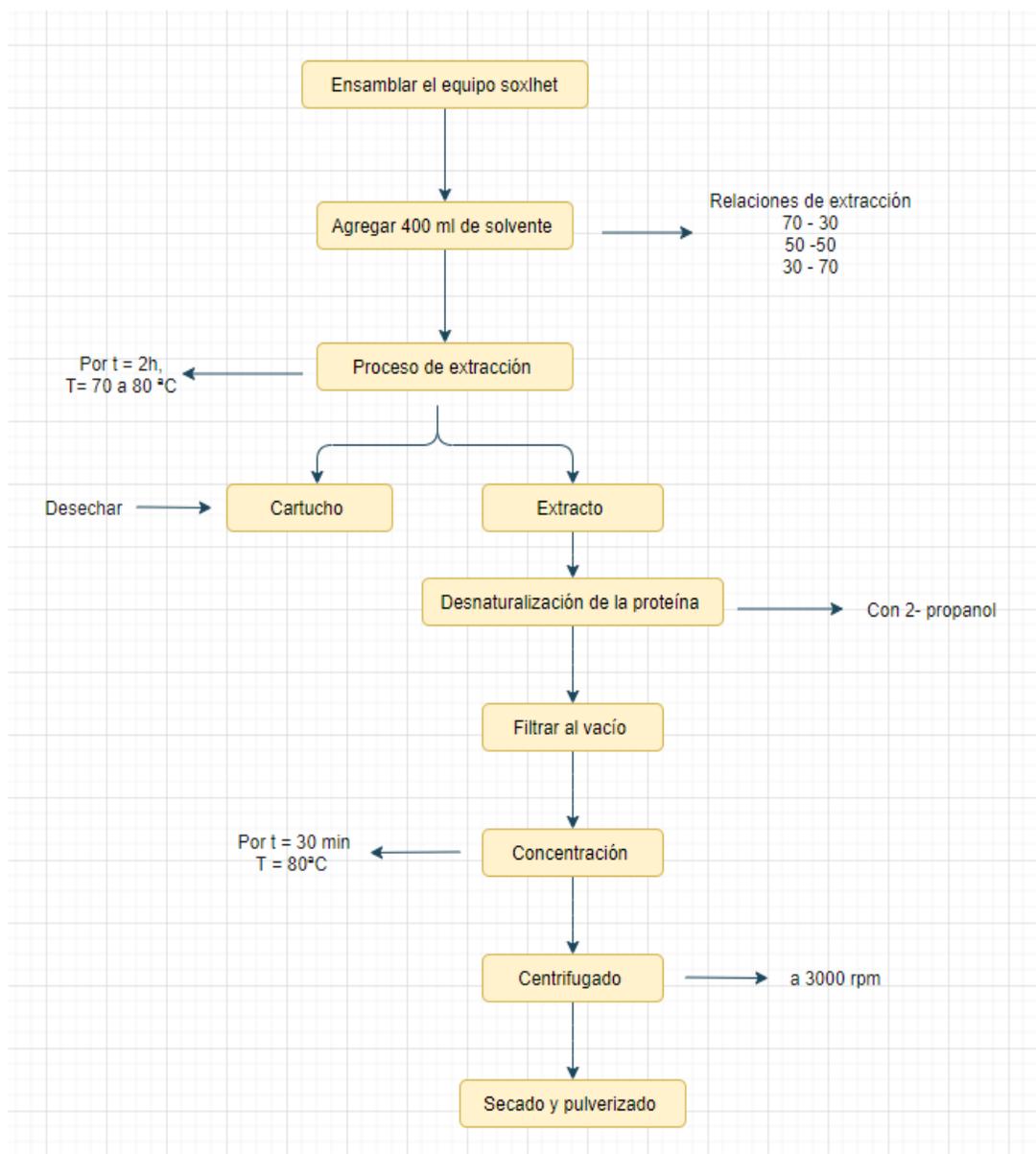
Tabla 7:

Optimización de la extracción del hongo para determinar los mejores parámetros

Muestra	Relación de:		Volumen en ml de:	
	Etanol	Agua	Etanol	Agua
1	70	30	280	120
2	50	50	200	200
3	30	70	120	280

Extracción soxhlet, elaboración propia.

Flujograma 3. Extracción soxhlet y concentración de la muestra.



#### 6.3.4. Extracción acida - básica

##### a. Precipitación del almidón

Se pesaron alrededor de 20 g de hongo en trozos de 2 cm con 200 ml de agua destilada a 55 °C por una 1 hora con agitación constante.



*Fotografía 10. Agitación constante de la muestra en agua destilada*

A temperatura constante regulamos el pH a 10.5 con NaOH 2M, con agitación constante por 60 minutos, dejándolo reposar por 12 horas, para la precipitación completa del almidón.



*Fotografía 11. Almidón extraído del hongo*

#### **b. Precipitación de proteínas**

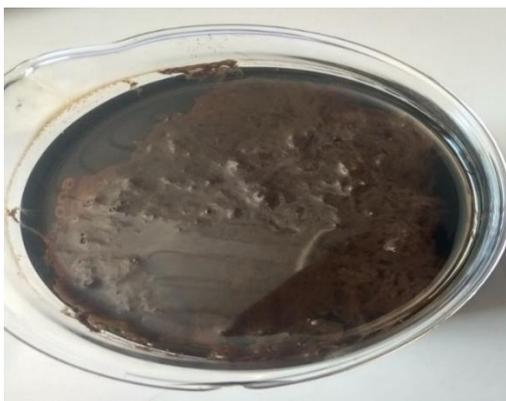
Se bajó el pH a 4.5 con HCl 2M, dejándolo reposar por 12 horas para la precipitación completa de las proteínas.



*Fotografía 12. Proteínas presentes en el hongo.*

### **c. Precipitación del $\beta$ – glucano**

Se añadió gotas de NaOH 2M hasta lograr un pH neutro, finalmente se realizó la precipitación de  $\beta$  – glucano con 2 – propanol, la mezcla fue agitada vigorosamente y dejada en reposo por 12 horas para lograr la precipitación completa de  $\beta$  – glucanos.



*Fotografía 13. Precipitación de beta-glucano*

El  $\beta$  – glucano obtenido fue pulverizado y llevado a un desecador por 48 h, hasta su uso.



Fotografía 14. Extracción de proteínas, almidón y beta-glucano.

Tabla 8.  
*Principios activos del hongo*

<b>Composición activa</b>	<b>Masa (g)</b>
Almidón	5.84
Proteína	4.71
Extracto	9.45

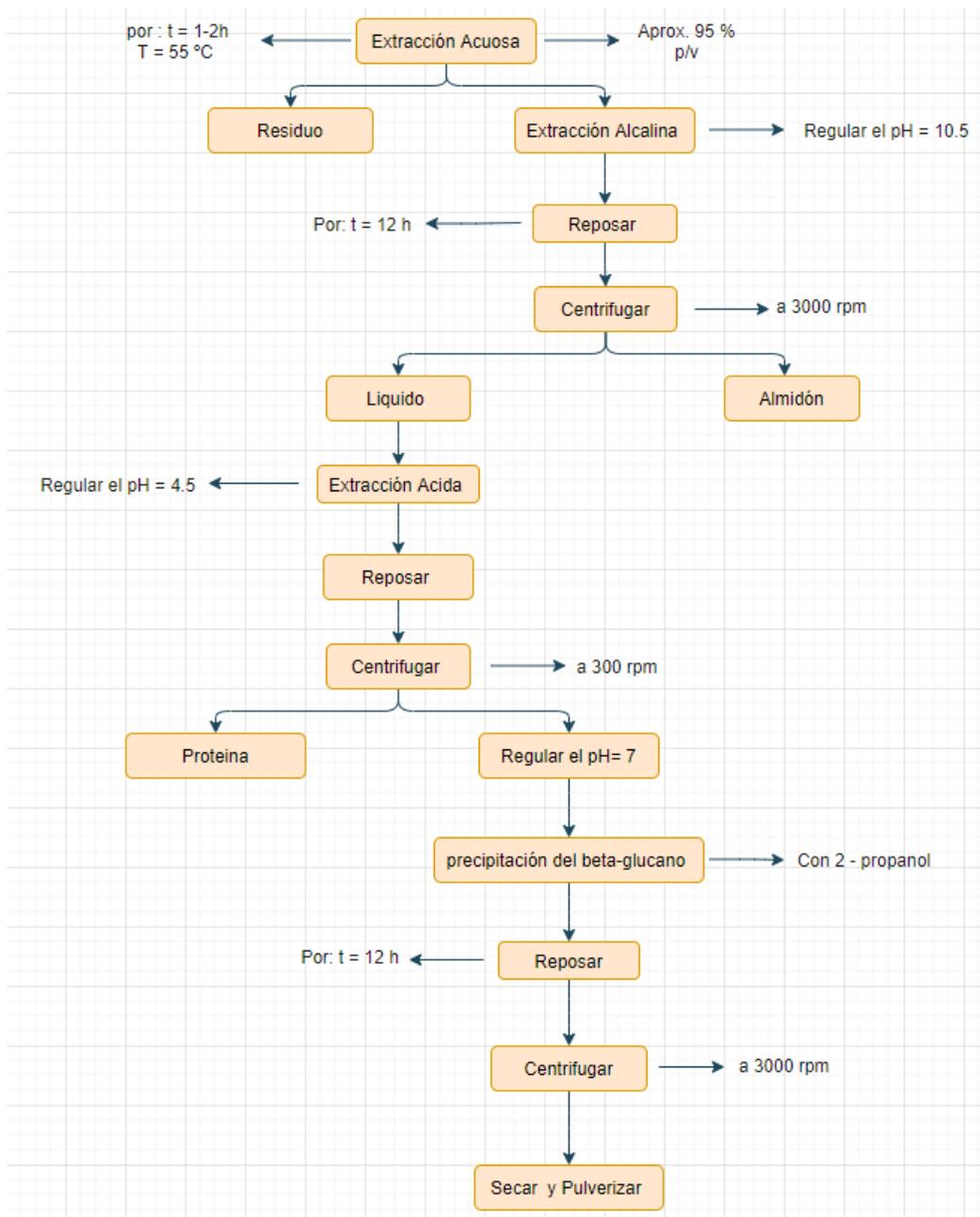
Composición activa en 20g de muestra de hongo.

Tabla 9.  
*Especificaciones organolépticas*

<b>Análisis Organolépticos</b>	
Aspecto	<i>Polvo fino</i>
Color	<i>Café</i>
Sabor	<i>Propio</i>

Ficha técnica de beta-glucano, elaboración propia

Flujograma 4. Etapas del proceso de extracción acuosa-básica-ácida.



## 7. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACION DE B-GLUCANOS

### 7.1.1. Caracterización cualitativa como azúcar reductor

#### a. Formación de espejo

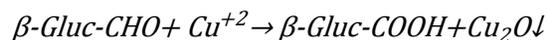
En un tubo de ensayo añadir 2 ml de solución de  $\beta$ -glucano con unos 0.05 mg de nitrato de plata, 5 gotas de amoníaco, una pastilla de hidróxido de potasio, exponer el tubo a calentamiento suave sin agitarlo, al poco tiempo se forma un espejo de plata.



Fotografía 15. Reducción del nitrato de plata amoniacal, formación de espejo

#### b. Reducción del licor de Fehling

Se sometió a calentamiento un tubo de ensayo con un contenido aproximado de 2 ml de licor de fehling hasta ebullición, se agregó 0.5 ml de una solución de  $\beta$ -glucano, se apreció una precipitación rojo ladrillo de óxido cuproso.



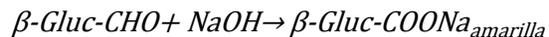


Fotografía 16. Reducción del licor de fehling

### 7.1.2. Caracterización cualitativa como glucosa

#### a. Reacción de Moore

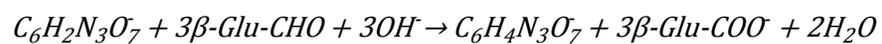
Se sometió a calentamiento suave un tubo de ensayo con 2 ml de solución de  $\beta$ -glucano, con una pastilla de hidróxido de sodio concentrado, aproximadamente después de 2 min la coloración cambia a un amarillo pálido.



Fotografía 17. Acción de los álcalis diluidos.

#### b. Reacción de Brown

Una solución de aproximadamente 2 ml de  $\beta$ -glucano, tratado con una pastilla de NaOH en caliente, da una sustancia fuertemente reductora que con 1 ml de ácido pírlico da un color pardo rojizo, que decolora el indicador azul de metileno.



Fotografía 18. Reducción del reactivo Brown

## 7.2. Preparación de la Curva de Calibración

Se prepararon soluciones patrón de glucosa en concentraciones de 10, 40, 60, 80 y 100 con una solución madre de concentración igual a 100  $\mu\text{g/ml}$ .



Fotografía 19. Matracas aforados con muestra patrón

### 7.2.1. Método fenol – sulfúrico

En un tubo de ensayo se adiciono 0.5 ml de glucosa, con 0.5 ml de fenol al 5 % y la adición rápida de 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se dejan reposar los tubos por 20 minutos, seguida de una agitación por 30 minutos con el vortex para una mejor homogeneidad.



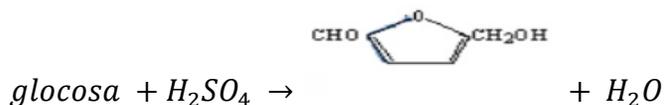
*Fotografía 20. Agitación de las soluciones estándares.*

Finalmente se deja reposar los tubos por 10 minutos en baño de agua fría, hasta que el color se estabilice por completo antes de tomar las lecturas.



*Fotografía 21. Tubos estándares para la realización de la curva*

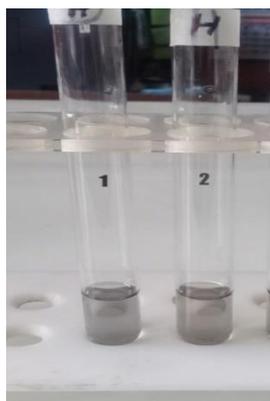
Observamos que la reacción toma un color violeta pálido, dando positivo para monosacáridos con reacción isotérmica por el desprendimiento de calor que genera la agregación del ácido sulfúrico.



El ácido sulfúrico deshidrata a la glucosa y permite la eliminación de un mol de agua dado paso a la formación de derivados de furfural como ser el hidroximetilénfurfural.

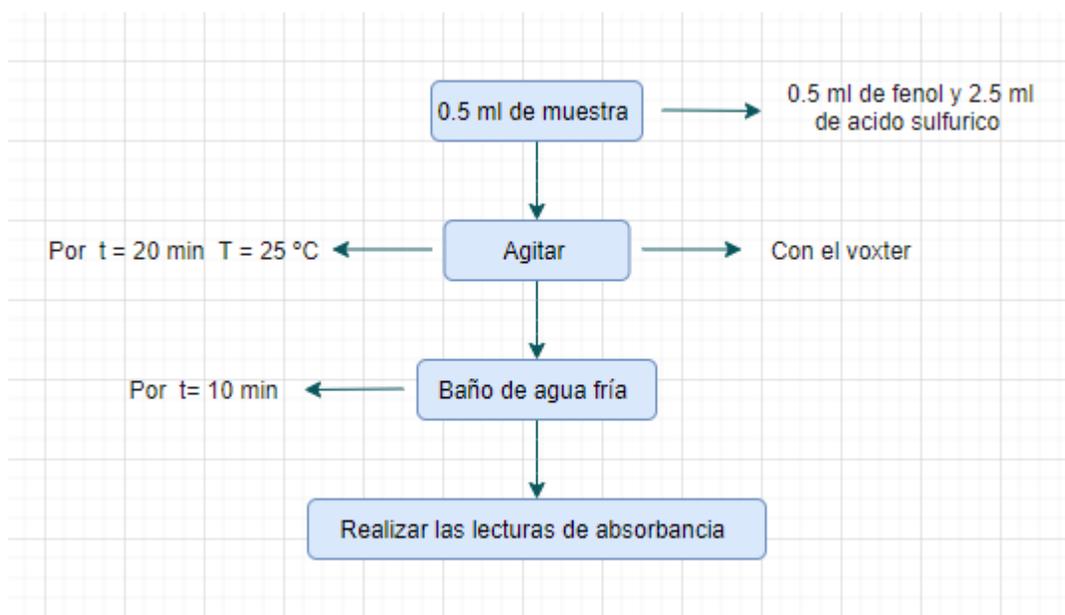
### 7.2.2. Preparación de la Muestra

Para la cuantificación de beta-glucanos presente en el hongo se disolvieron 0.5435 g de muestra finamente pulverizada en agua destilada, una vez disuelta la muestra se aforo a 500 ml para realizar una disolución y someterlo al método fenol – sulfúrico



Fotografía 22. Muestras de hongo para su cuantificación

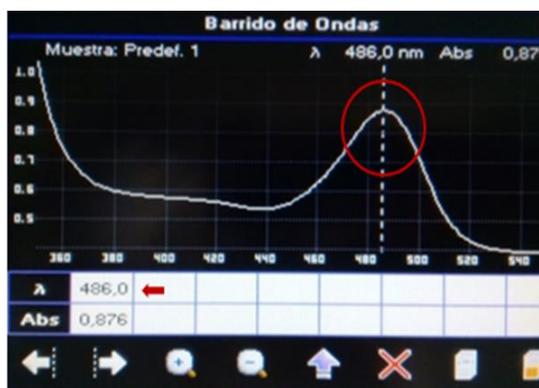
Flujograma 5. Preparación de la muestra por el método fenol-sulfúrico por duplicado



### 7.3. Cuantificación del beta-glucano

#### 7.3.1. Identificación por uv-visible

La cuantificación de los carbohidratos y polisacáridos pueden ser determinados como monosacáridos, se procedió a la realización de un barrido en el espectro uv-visible con un patrón de concentración conocida.



Fotografía 23. Barrido del tercer patrón, cuya longitud de onda es 486 nm.

La curva de nuestro barrido muestra una longitud de onda igual a 486.0 nm y una absorbancia igual a 0.152, en el espectrofotómetro visible-uv de barrido.



Fotografía 24. Espectrómetro visible-uv BIOCHROM de barrido-Libra

### 7.3.2. Identificación infrarroja

Para asegurarnos que el extracto obtenido del hongo sea en realidad beta-glucano se realizó un análisis del espectro infrarrojo.



Fotografía 25. Espectrómetro visible-uv BIOCHROM de barrido-Libra

La muestra fue colocada en una plaqueta de cuarzo para su identificación correcta. Se realizó la calibración del equipo utilizando como blanco aire, a una longitud de onda de 486 nm.



*Fotografía 26. Preparación de la muestra para la pronta lectura en el IR*

## 8. APLICACIÓN DEL BETA-GLUCANO EXTRAÍDO

### 8.1. Aplicación de beta-glucano en productos lácteos

La FDA (Administración de alimentos y medicamentos), aprobó el consumo de  $\beta$ -glucano derivados de hongos, como ingrediente alimentario en una porción de hasta 150 mg, en bebidas lácteas, que cumpla con los requisitos necesarios de las buenas prácticas de manufactura (NM-324:2010). Debido a que la formulación de cada bebida láctea permite la incorporación de nuevos ingredientes activos que no superen la ingesta diaria permitida de acuerdo a la edad de la población que lo consume.

### 8.2. Ingesta de beta-glucano

Tabla 10.

*Ingesta de beta-glucanos por persona en mg/día*

Población	Edad (años)	Consumo de persona por día (mg)	
		Min.	Max.
Infantes	0 a 2	224.1	287.3
Niños	3 a 11	389.8	397.7
Mujeres adolescentes	12 a 19	330.9	361.8
Varones adolescentes	12 a 19	436.2	476.4
Mujeres adultas	20 en adelante	238.7	278.2
Varones adultos	20 en adelante	290.6	355.1

Estudio realizado por la USDA y FDA.

### 8.3. Proceso tecnológico de la leche

#### 8.3.1. Recepción de la leche cruda

La recepción se realizó directamente del proveedor lo que nos permitió realizar los controles organolépticos de la leche cruda como ser: color, olor, aspecto característico de la leche según la NB 33013 - Productos Lácteos – leche cruda y fresca

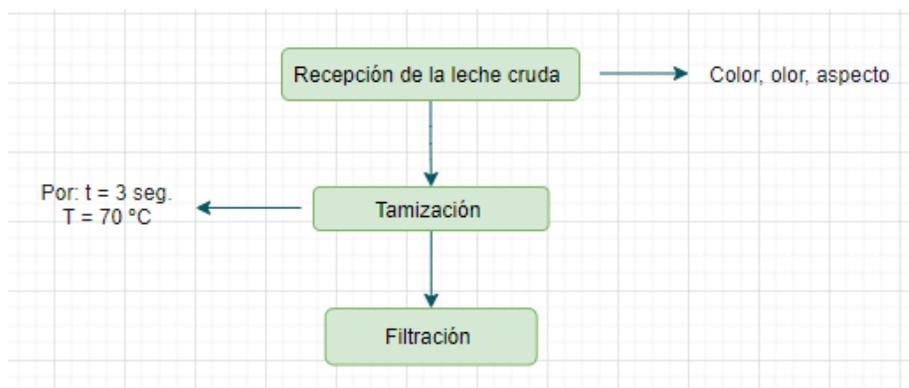
#### 8.3.2. Termización

Es un proceso de conservación que consiste en calentar la leche a una temperatura de 70°C, durante 15 segundos, permitiendo la destrucción de microorganismos patógenos presentes en la leche.

#### 8.3.3. Filtración

Mediante esta operación se eliminará todas las impurezas presentes en la leche, que puedan afectar los puntos de control y puntos críticos en el proceso de producción del yogur que afecte el nivel de calidad del producto terminado.

*Flujograma 6. Proceso tecnológico de la leche*



## **8.4. Proceso tecnológico de la elaboración de yogur**

### **8.4.1. Estandarización**

La materia grasa y sólidos no grasos presente en la leche debe ser estandarizada para la obtención de un producto de calidad uniforme, esto se puede lograr aumentando de manera controlada la cantidad de sólidos totales presentes en la leche cruda.

### **8.4.2. Aditivos usados en la elaboración**

Las condiciones de uso de aditivos están reglamentadas estrictamente bajo la especificación técnica disponible ETD 33036 que es un complemento a la norma NB/NA 0078 Requisitos para Leches fermentadas.

#### **a. Agentes estabilizantes.**

Permite modificar la consistencia del yogur y la incubación de este.

#### **b. Agentes edulcorantes**

La adición de agentes edulcorantes aumentan el sabor ácido, la cantidad agregada debe ser menor a 10% debido a su poder inhibidor sobre el crecimiento de las bacterias.

#### **c. Agentes conservantes**

Los conservantes evitan la proliferación de microorganismos, presentes en cada producto elaborado, por lo tanto, solamente son útiles con materias primas de buena calidad.

#### **8.4.3. Adición de nutrientes**

Uno de los objetivos de la norma boliviana NB 887 (Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos), es de impedir la adición indiscriminada de nutrientes esenciales a los alimentos, disminuyendo así el peligro de riesgos para la salud debido a excesos, deficiencias o desequilibrios de nutrientes esenciales.

#### **8.4.4. Tratamiento térmico**

En la elaboración de productos fermentados se da a la leche un tratamiento térmico cuya temperatura va entre 90 a 95 °C por 5 minutos. El propósito de esto es mejorar la consistencia del producto final y mejorar el medio para el cultivo.

#### **8.4.5. Incubación**

La producción de yogur es un proceso biológico en el cual los microorganismos del cultivo convierten la lactosa en ácido láctico y a un cierto pH tiene lugar la coagulación, el tiempo de fermentación varía entre 3 a 6 horas dependiendo del cultivo utilizado.

#### **8.4.6. Ruptura y enfriamiento del coagulo**

La ruptura del coagulo se realiza mediante la agitación para realizar una masa homogénea, brillante y viscosa. El enfriamiento tiene por objeto restringir el crecimiento bacteriano y la actividad enzimática lo más rápido posible, para evitar la sobre-acidificación.

#### **8.4.7. Inclusión de beta-glucanos en yogur**

La inclusión de beta-glucano en el yogur es de 250 mg por cada 100 ml de yogur para poder aumentar el contenido de fibra en los carbohidratos sin afectar de una manera negativa la textura, pH, viscosidad y el color de forma negativa que impida el consumo o la comercialización de nuestro yogur.

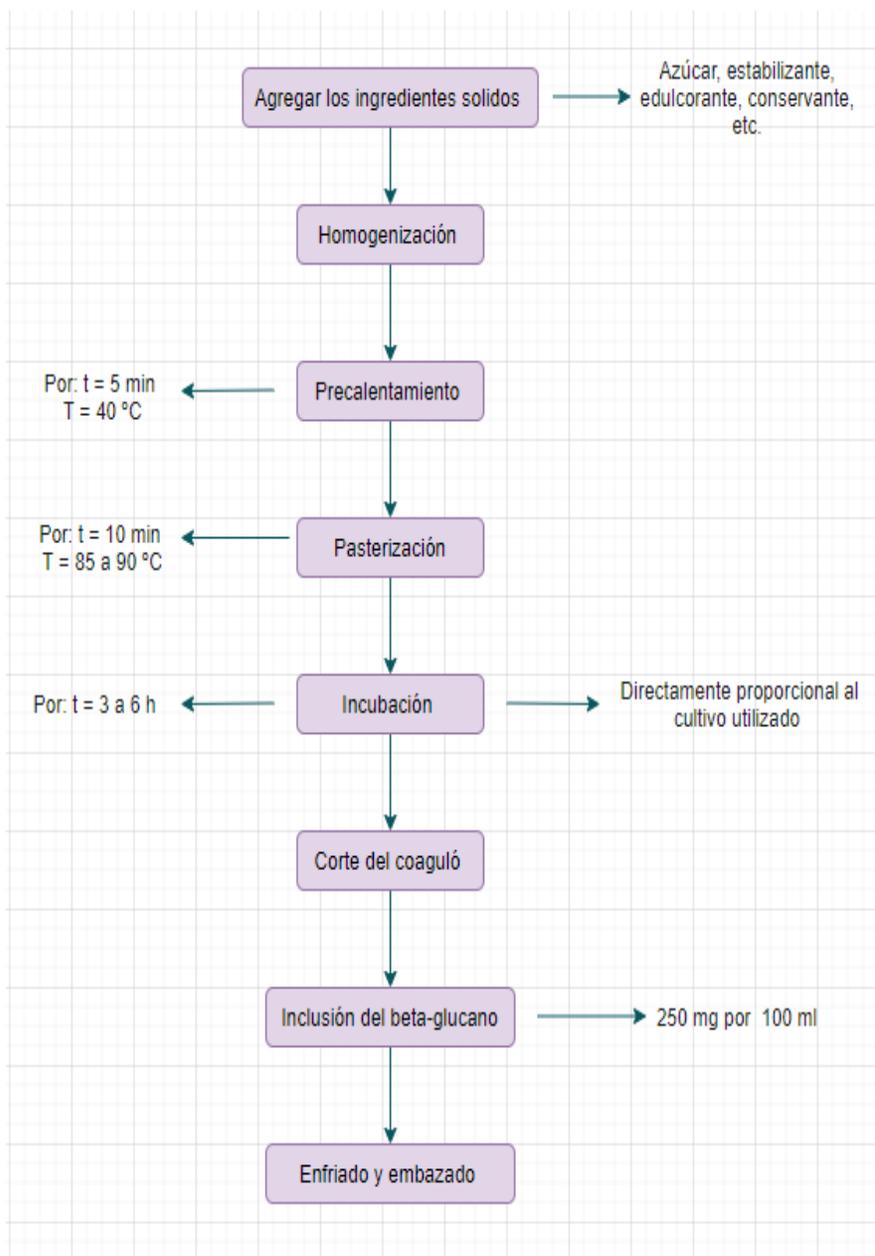
#### **8.4.8. Envasado y etiquetado**

Se deberá envasar el yogur a una temperatura aproximada de 20 a 22 °C, una vez finalizado el envase se precede a la etiquetación del yogur.

#### **8.4.9. Almacenamiento**

El almacenamiento parcial del yogur tiene como objetivo asegurar la calidad del producto para su debida distribución y comercialización.

Flujograma 7. Proceso yogur bebible

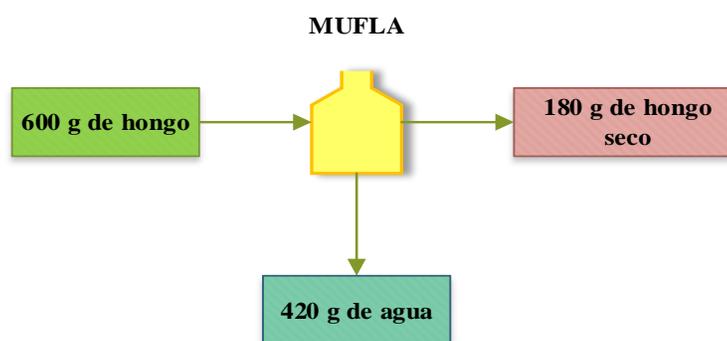


## 9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 9.1. Contenido de humedad

A través de un balance de materia se pudo calcular aproximadamente el contenido de humedad del hongo correspondiente a la deshidratación.

*Flujograma 8. Balance de masa*



### 9.2. Cuantificación de la extracción de beta-glucanos

#### 9.2.1. Extracción soxhlet

Tabla 11.

*Porcentaje de los beta-glucanos obtenidos a partir de los extractos evaluados*

n°	Extractos		Masa obtenida (g)
	% alcohol	% agua	
1	70	30	1.6
2	50	50	0.4
3	30	70	0.1

Extraídos en 400 ml de disolvente.

La Tabla contiene información sobre la masa extraída de beta-glucanos que se obtuvo en las diferentes relaciones de etanol-agua en contacto con la muestra, dando resultados de forma descendente para cada fracción de extractos.



*Grafica 1. Masa de beta-glucano en los extractos evaluados*

El mayor rendimiento de extracción de beta-glucanos fue obtenida en la relación 70:30, con cuatro recirculaciones seguidas por arrastre de vapor y un tiempo total de 2 horas con un rendimiento mayor al 1%. Las extracciones 50:50 y 30:70 tuvieron un rendimiento de extracción menor al 1 %, lo que nos indica que la extracción del beta-glucano presente en el hongo es directamente proporcional al porcentaje de alcohol presente en el solvente orgánico.

### **9.2.2. Extracción acuosa-ácida-básica**

En la siguiente tabla se detalla los porcentajes extraídos de proteína, almidón y beta-glucano por el método ácido – básico presentes en el hongo.

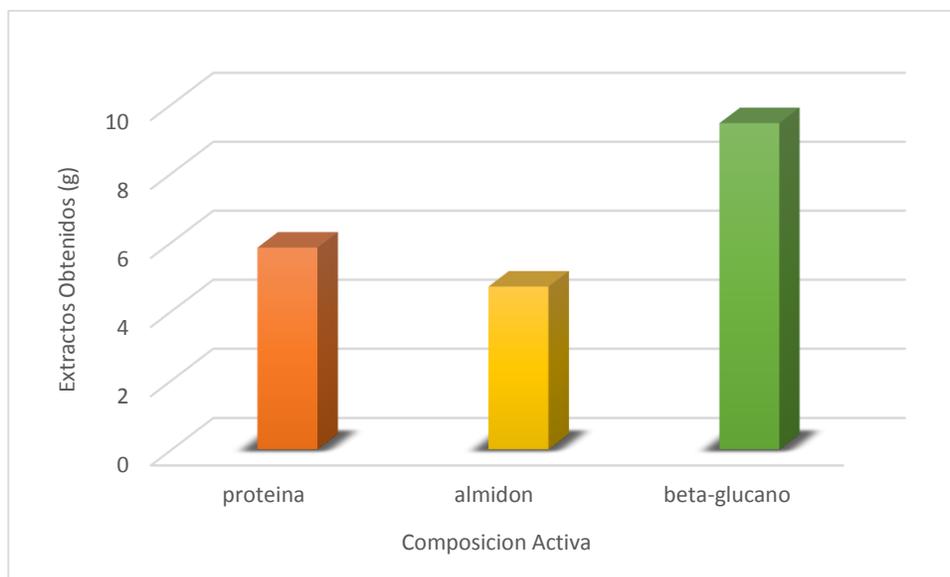
Tabla 12.

*Porcentaje de composición activa obtenida a partir del hongo*

<b>Composición activa</b>	<b>Extractos obtenidos (g)</b>
Proteína	5.84
Almidón	4.71
Beta-glucano	9.45

Disuelta en 200 ml de agua destilada

La Tabla contiene información sobre la composición activa del hongo que se obtuvo en cada etapa de extracción ácido – básico.



*Gráfica 2. Masa de la composición activa extraída del hongo*

En la gráfica se observó los resultados del contenido de proteína, almidón y beta-glucano como principio activo del hongo deshidratado, con resultados del 5.84g de proteína, 4.71g de almidón y 9.45g de beta-glucano.

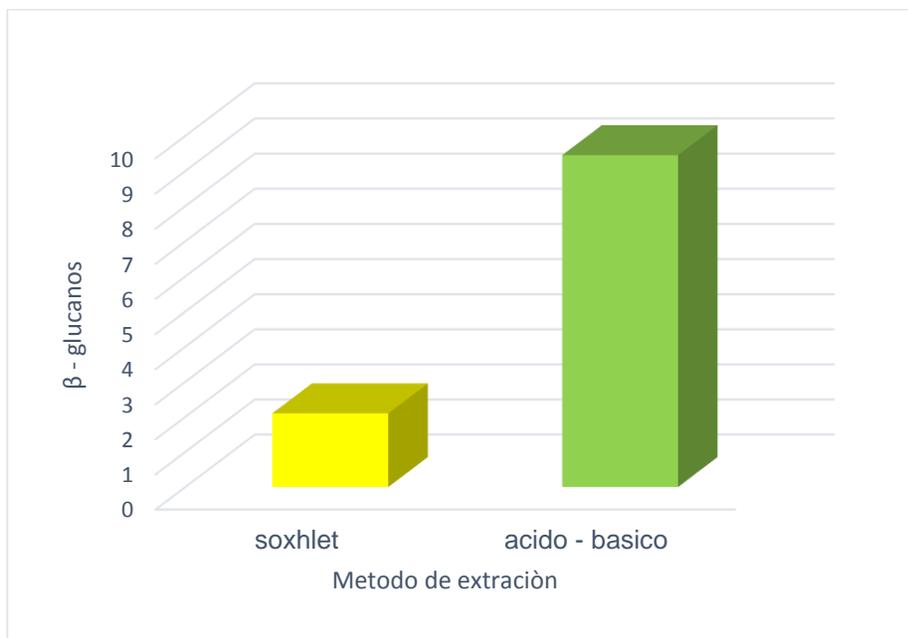
### 9.3. Comparación de beta-glucano extraído a partir de los dos métodos

En la siguiente tabla se detalla la cantidad en porcentajes de beta-glucanos que fueron extraídos, a partir de los métodos utilizados.

Tabla 13.  
*Porcentaje de beta-glucano extraído*

Método usado	Masa de $\beta$ – glucano (g)
Extracción soxhlet	2.1
Extracción acido – básico	9.45

Comparación porcentual de beta-glucano obtenido por ambos métodos de extracción



Grafica 3. Comparación porcentual de beta-glucano

Comparando estos dos métodos, se puede observar una mayor masa de extracción en el método acido – básico con 9.45 g de  $\beta$  – glucano

## 9.4. Cuantificación de beta-glucano

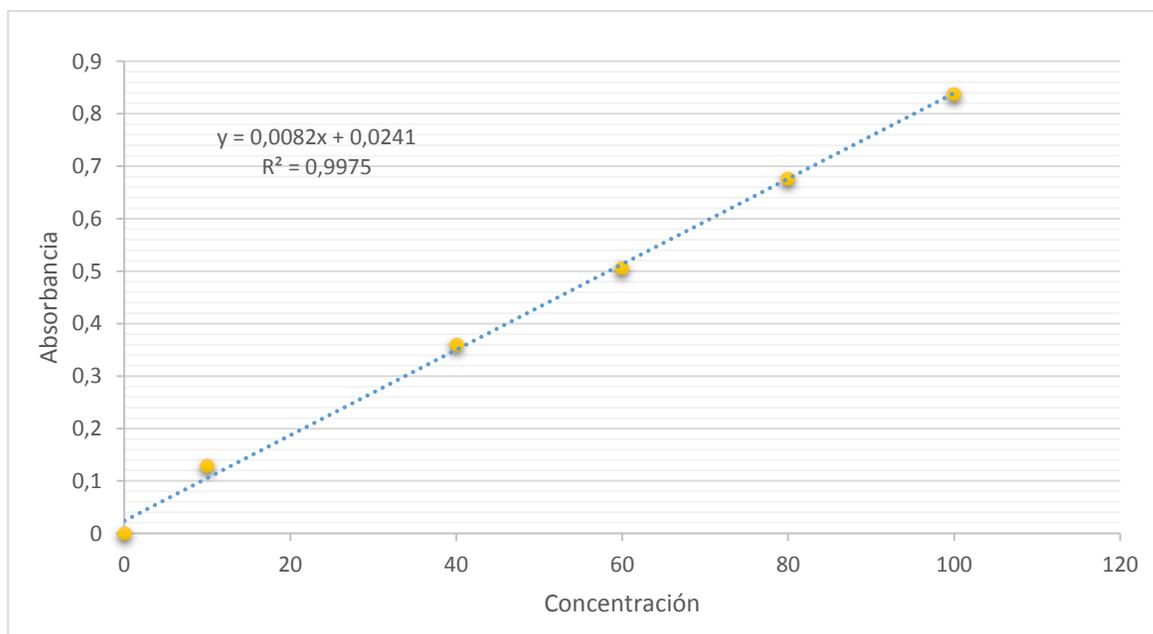
### 9.4.1. Curva de calibración para el espectro uv-visible

Tabla 14.

*Curva de calibración de estándares*

Concentración μg/ml	Absorbancia
0.0	0.000
10.0	0.129
40.0	0.360
60.0	0.506
80.0	0.677
100.0	0.837

La ecuación lineal obtenida es  $y = 0.0082x + 0.0241$ .



*Grafica 4. Curva de calibración del método ácido sulfúrico uv-visible*

Se obtuvo un coeficiente de regresión  $R^2$  igual a 99.75 % lo que indica una buena asociación lineal, esto nos permite predecir la concentración de beta-glucano como un azúcar reductor.

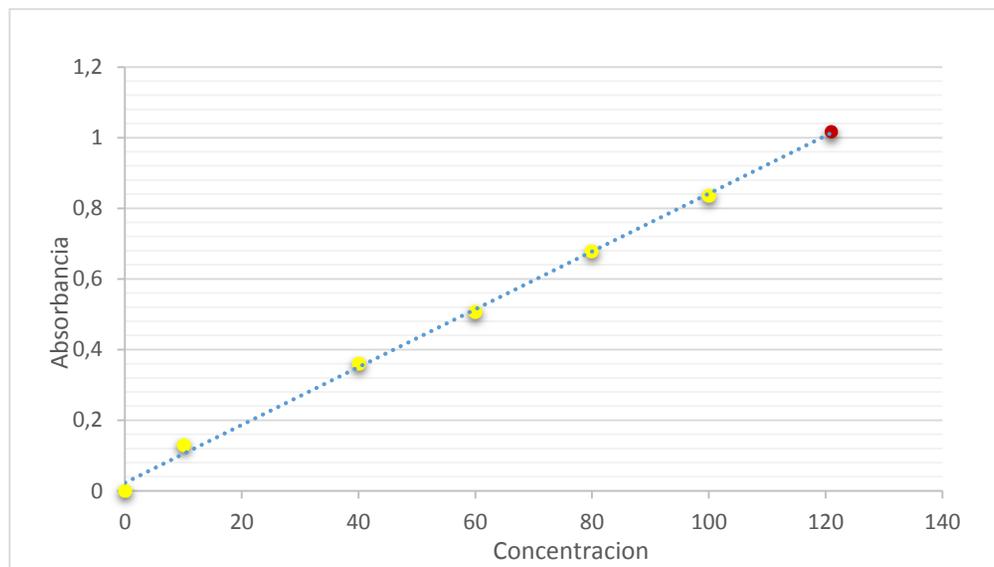
### 9.5. Concentración de beta-glucano

Tabla 15

*Concentración de beta-glucano como azúcar reductor*

Muestra	Absorbancia (nm)
1	1.010
2	1.016
3	1.023
<b>Promedio</b>	<b>1.016</b>

Los valores fueron obtenidos a través de la ecuación  $y = 0.0082x + 0.0241$ .



*Gráfica 5. Concentración de beta-glucanos en la curva de calibración uv-visible*

Para hallar la concentración de beta-glucano, se utilizará la ecuación que representa la recta de calibración, donde “x” representa la concentración de beta-glucano y “y” la absorbancia.

$$\text{conc. de } \beta - \text{glucanos} = \frac{1.016 - 0.0241}{0.0082}$$

$$\text{Conc. de } \beta - \text{glucanos} = 120.96 \mu\text{g/ml en hongos}$$

Para la disolución se tomaron 10 ml de alícuota y se aforo en un matraz de 100 ml, por tanto:

$$120.96 \mu\text{g/ml} \rightarrow 1 \text{ ml}$$

$$x \rightarrow 100 \text{ ml}$$

$$x=100\text{ml} \times \frac{120.96 \mu\text{g/ml}}{1 \text{ ml}} = 12096 \mu\text{g/ml}$$

### 9.5.1. Cantidad de beta-glucano

La masa experimental de beta – glucano presente en el hongo, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{masa}_{\text{obt.}} = 500 \text{ ml} \times \frac{12096 \mu\text{g}}{100 \text{ ml}} = 60480 \mu\text{g}$$

$$\text{masa}_{\text{obt.}} = 60480 \mu\text{g} \times \frac{1\text{g}}{10^6 \mu\text{g}} = 0,0605\text{g}$$

### 9.5.2. Porcentaje de beta – glucano obtenido

$$\% \beta - \text{glucano} = \frac{\text{masa}_{\text{obtenida}}}{\text{masa}_{\text{inicial}}} \times 100 \%$$

$$\% \beta - \text{glucano} = \frac{0.0605 \text{ g}}{0.5435 \text{ g}} \times 100 \% = 11.13 \%$$

Tabla 16.

Comparación de polisacáridos extraídos del hongo, raíces de dalia, penca de tuna

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g)</b>	<b>% Experimental</b>	<b>% Bibliográfico</b>	<b>Fuente</b>
Hongos	0.5435	11.13	13	Elaboración propia
Dalia	0.8213	7.31	16.56	Proyecto por Univ. Midory Chipana
Penca	50	0.03	10	Proyecto por Univ. Ramiro Cusi

Elaboración propia

### 9.5.3. Rendimiento

Las muestras de  $\beta$  – glucano en un inicio fue de 420 g de hongo seco, luego de realizar la extracción soxhlet y la extracción ácido – básico dando una masa seca total de 11.5 g, por tanto, nuestro rendimiento fue de:

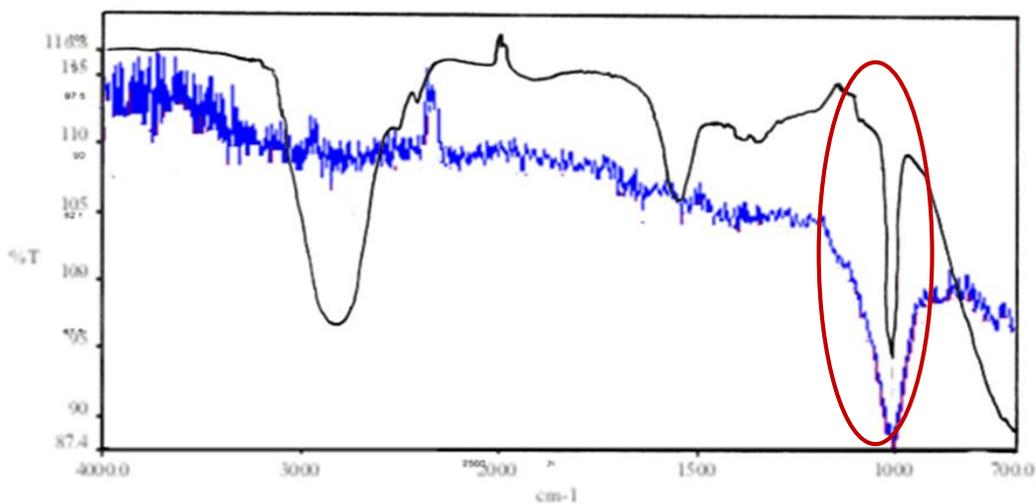
$$\% \text{ Rend.} = \frac{\textit{masa}_{\textit{final}}}{\textit{masa}_{\textit{inicial}}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rend.} = \frac{11.55 \text{ g}}{420 \text{ g}} \times 100 \% = 2.75 \%$$



Fotografía 27. beta - glucano extraido

## 9.6. Análisis estructural del $\beta$ -glucano



El espectro obtenido para el extracto, fue caracterizado por IR, muestra una banda de absorción en la región de la huella dactilar, alrededor de 1010  $\text{cm}^{-1}$  la cual es característica de los enlaces beta-glucosídico. En este espectro igual se observa bandas de 1650  $\text{cm}^{-1}$  que son características que están relacionadas con enlaces amino-azucares.

### 9.7. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas del producto de aplicación

Tabla 17.

*Características fisicoquímicos del yogur sin beta-glucano*

<b>Parámetros</b>	<b>Base</b>	<b>Corte coágulo</b>	<b>Producto terminado</b>
<b>pH</b>	6.55	4.50	4.40
<b>Acides (%Ac. láctico)</b>	0.10	0.5	0.5
<b>Brix</b>	16.2	14.0	13.5
<b>Viscosidad (seg.)</b>	---	350	80

Valores registrados en la formulación del yogur para la aplicación de beta-glucano.

En la tabla se aprecia los puntos críticos de control que intervenir en la calidad del yogur, y los valores registrados en las preparaciones de la base y en el corte de coágulo obtenido en la fermentación, y en el producto final, este valor nos servirá como guía para evaluar los cambios fisicoquímicos que puedan presentarse con la incorporación del beta-glucano.

Tabla 18.

*Evaluación de las características fisicoquímicos del yogur con beta-glucano*

<b>Parámetros</b>	<b>Base</b>	<b>Corte coágulo</b>	<b>Producto terminado</b>
<b>pH</b>	6.55	4.50	4.45*
<b>Acides (%Ac. láctico)</b>	0.10	0.5	0.58*
<b>Brix</b>	16.2	14.0	14.5*
<b>Viscosidad (seg.)</b>	---	350	60*

(\*) Indican la variación en los valores obtenidos en la tabla 18.

Para la variable del pH se encontró un incremento del 0.05%, para la acidez se registró una variación del 0.08%, en cuanto a la viscosidad se registró una variación 1%.

## 9.8. Trazabilidad del producto final

Tabla 19.

*Seguimiento de la trazabilidad del producto terminado*

<b>Parámetros</b>	<b>0 días</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>	<b>21 días</b>
<b>pH</b>	4.58	4.50	4.50	4.50
<b>Acides (%Ac. láctico)</b>	0.73	0.75	0.75	0.75
<b>Brix</b>	14.7	14.8	14.8	14.8
<b>Viscosidad (seg.)</b>	75	75.3	75.3	75.3

Trazabilidad para un tiempo de vida útil y almacenamiento de 21 días.

Los cambios registrados en cada PC fueron poco significativos, a los 7 días de vida útil del producto se observa una variación del 0.01 % en cada parámetro fisicoquímico de control, y a partir de los 7 días de vida útil en adelante se registra los parámetros fisicoquímicos sin ninguna variación. Se debe aclarar que los parámetros estudiados no afectan en la inocuidad del yogur, por lo tanto, no se considera como PCC.

Tabla 20.

*Comparación de los valores fisicoquímicos bajo norma y obtenidos*

<b>Parámetros</b>	<b>Norma boliviana</b>		<b>Producto terminado</b>		<b>21 días de vida útil</b>
	<b>LI</b>	<b>LS</b>	<b>LI</b>	<b>LS</b>	<b>LI</b>
<b>Acides (%Ac. láctico)</b>	0.6	1.4	0.68	0.75	0.68*
<b>pH</b>	4.0	---	4.65	4.70	4.57*

Comparación de los requisitos fisicoquímicos exigidos por norma boliviana y el CODEX, con el producto terminado y la trazabilidad en los 21 días útiles de vida del producto

Los valores obtenidos en el producto terminado y en los días útiles de vida se encuentran dentro de los límites superiores e inferiores establecidos por la norma boliviana elaborada por IBNORCA y el CODEX Alimentarius.

## 10. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

### 10.1. Conclusiones

- El proceso para la extracción del beta-glucano a partir del hongo, fue optimizado para mejorar el rendimiento. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo bajo las normas de buenas prácticas de manufactura BPM 324 para asegurar la inocuidad del producto final.
- La extracción soxhlet que genero mayor rendimiento fue aquella en la que se empleó una relación 70:30 de alcohol: agua, esto es 140 ml de alcohol por 60 ml de agua en 400 g de hongo. La extracción se realizó a una temperatura no mayor de 80°C por 2h con cuatro recirculaciones seguidas.
- La extracción acido – básico en comparación a la extracción soxhlet genero un mayor porcentaje de extracto, con un total de 2.1% w/w en la extracción soxhlet y un 9.45% w/w en la extracción acido – básico.
- La concentración de beta- glucanos extraída fue del 11.13 %, con un rendimiento final del 2.75 %, este último debido quizás a la perdida de extracto en las filtraciones al vacío.
- La concentración experimental fue de 11,13 %, comparándolo con la extracción teórica de otro hongo 12,98 % y la extracción teórica de la avena 9,87%, se puede apreciar un mejor rendimiento.

- La espectroscopia FT-IR logró identificar los grupos funcionales presentes en el extracto confirmando la presencia de enlaces glucosídico que pueden ser beta-1-3-glucano y beta-1-6-glucano.
- Para la inclusión de beta-glucano como nutriente esencial se consultó las siguientes normas bolivianas. ETD 33036 (Requisitos para leches fermentadas con adición de nutrientes). NB 887 (Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos).
- Para evaluar el comportamiento del beta-glucano como un nutriente esencial, se realizó un seguimiento minucioso en los parámetros fisicoquímicos como ser: acidez, pH en la base del producto de aplicación, acidez, pH y viscosidad en el corte de coágulo, acidez, pH y viscosidad en el producto terminado.
- La inclusión de beta-glucanos en el yogur no altero los parámetros organolépticos como ser: sabor, olor, color y aspecto del producto final elaborado, dándonos un nivel de calidad aceptable para su uso.
- La leche cruda y fresca que se utilizó para la producción de yogur debe cumplir la norma NB 33013 (Requisitos para leche cruda y fresca), la toma de muestra para realizar el control de parámetros fisicoquímicos de la leche cruda y fresca debe ser recolectada bajo la norma NB 707 (Guía para el muestreo de productos lácteos), el proceso de elaboración del alimento para la aplicación del beta-glucano debe cumplir la norma NB/ISO 22000 (Sistema de la inocuidad de los alimentos) y NB 855 (Principios generales de higiene de los alimentos).

## 10.2. Recomendaciones

- En cuanto a la extracción acuosa-básica-ácida, resulta útil analizar la separación de almidón y proteínas para su aplicación en productos industriales.
  
- Sería factible utilizar la técnica de extracción ultrasónica para aislar el compuesto activo del hongo con el objetivo de obtener beta-glucanos con masa polar promedio específica y los efectos del mismo en la salud.
  
- Se recomienda estudiar la extracción de diferentes cereales producidos en nuestro país para la obtención de sus principios activos.
  
- En cuanto a la aplicación de la beta-glucano en productos fermentados como ser el yogur sería interesante evaluar de manera amplia la posible inclusión de estos en diferentes alimentos procesados.

## BIBLIOGRAFÍA

Centro de Documentación e Información Bolivia (CEDIB), 2005. Datos de la gestión de los recursos naturales en Bolivia. Cochabamba, Bolivia.

Díaz, C.B., 2015. Composición química y antioxidante en setas comestibles (trabajo de fin de grado) Grado en Nutrición Humana y Dietética.

Especificación técnica disponible, ETD & Instituto Boliviano de Normalización y Calidad, IBNORCA., 2012. ETD/NB 33036 Productos Lácteos – Leches Fermentadas con adición de nutrientes – Requisitos, ICS 67.100.10 Leche y productos lácteos procesados, CTN N°3.3 productos lácteos.

Fuentes, V.J., Velasco C.M. & Villalpando A.R., 2005. Producción experimental de hongos comestibles en la Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales. Cambio Rural 1: Sucre, BO, p. 7-8.

Gamonal, K.A. & Marrufo R.H., 2016. Efecto de la poda y limpieza del sotobosque para la producción y calidad del hongo (*Suillus luteus*), en plantaciones de pino (*Pinus Patula* l.), distrito de Cutervo, región Cajamarca” (Tesis para Ingeniería Agrónomo) Lambayeque-Perú.

Gonzales, M.I., 2015. Alimentos funcionales obtenidos a partir de hongos nutraceuticos (Proyecto de Grado para Químico Industrial).

Hawksworth, D.L., 2004. Fungal diversity and its implications for genetics resource collections. *Studies in Micology* 50:19-18.

Hernández, A.F., 2009. Producción de beta-glucanos a partir de hongos basidiomiceto *schizophyllum commune* (Proyecto de Investigación). República Mexicana.

Heras, A.A., 2014 – 2015. Beta-glucanos: estructura química, fuentes biológicas efectos inmunomoduladores (trabajo de fin de grado) Universidad de Valladolid.

Hosse M., 2012. NM 324:2010. Industria de alimentos – Buenas Prácticas de Manufactura – Requisitos.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 2005. NB 855. Código de prácticas – Principios generales de higiene de los alimentos, ICS 67.020 Procesos de la industria alimentaria.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 2009. NB 314001. Etiquetado de alimentos pre-envasados, ICS 67.230 Alimentos pre-envasados y cocinados, CTN N° 3.14 – Etiquetado de productos alimentarios.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 2009. NB 314004. Etiquetado nutricional, ICS 67.230 Alimentos pre-envasados y cocinados

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 2005. NB – ISO 5538. Leche y productos lácteos – Muestreo – Inspección por atributos, ICS 67.100.10 Leche y productos lácteos.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 2005. NB 707. Leche y Productos lácteos – Guía para el muestreo, ICS 67.100.10 Leche y productos lácteos.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 2009. NB/NA 0078. Leches fermentadas – Requisitos, ICS 67.100.10 Leche y productos lácteos.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., NB 33013. Productos Lácteos – leche cruda y fresca – Requisitos, ICS 67.100.10 Leche y productos lácteos procesados, CTN N° 1.2 – Gestión y aseguramiento de la calidad.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 1997. NB 887. Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos, ICS 67.020 Procesos de la industria alimentaria.

Instituto Boliviano de Normalización y Calidad., IBNORCA., 1999. NB 800. Principios generales del Codex Alimentarius, ICS 01.120 Normalización. Reglas generales.

Jiménez, M., J. Pérez, J.J. Almaraz & M. Torres 2013. Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en valles centrales, Oaxaca. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 2.

Luengo, E., 2007. Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, editorial Copyright Sociedad Española de Cardiología.

MSc. López, X., Taramuel A., PhD. Arboleda C., PhD. Segura F. & Esp. Restrepo L.F. 2016-2017. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. Rev. Cubana Química Vol. 29.

Melgarejo, E., 2014. Dos hongos silvestres comestibles de la localidad de Inca-chaca, Cochabamba (Yungas de Bolivia). ACTA NOVA 6(4):385-395.

Melgarejo, E., 2015. Algunos usos de los hongos silvestres de Bolivia en el contexto sudamericano, Edición Universitaria de Cochabamba Bolivia.

Ochsner, R., 2019. El hongo del pino (*Suillus luteus*) como alternativa proteica para cubrir deficiencias nutricionales en infantes menores de 6 años que habitan hogares con inseguridad alimentaria en la comunidad indígena de Guayama grande, parroquia de chugchilan en el periodo 2017-2018. (Tesis para licenciatura en nutrición). Ecuador.

Pizarro, C.S., Ronco M.A. & Gotteland M.R., 2014 beta-glucanos que tipos existen y cuáles son sus beneficios para la salud. Rev. Chilena Nutricional. Vol. 41.

Rocabado, D. R., S. Curchill, O.Z. Maillard, C.T. Lasema & H. Leschinski 2011. Bolivia Ecológica. Rev. n° 62 Editorial centro de ecología difusión Simón I. Patiño.

Rocabado, D.R., J.E., Wright, O.Z. Maillard & N.F. Muchenik. 2007. Catálogo de los hongos Gasteromycetes (fungí Basidiomycotina) de Bolivia. Kempffiana.

Smith, J. E., Sullivan, R. & Román, N., 2005. Setas y cáncer terapia. Biologiat, Diciembre, 52(6), pp. 328-336.

Sucasaca, J.J., 2009. Identificación y caracterización morfológica de especies nativas de hongos comestibles en humedales y bosques de la provincia Camacho, departamento de La Paz (Tesis de Grado). La Paz-Bolivia.

Talavera, M.E., 1996. Determinación de Glucanos en Subproductos y Evaluación del efecto de microorganismos Glucanolíticos sobre Mycosphaerella en banano (Tesis de Maestría). Turrialba Costa Rica.

Valeriano, J.J., 2011. Efecto Del Sustrato En La Producción Del Hongo Comestible Shiitake (Lentinula edodes (berk) Pegler) En Ambiente Protegido, en el departamento de Tarija. (Tesis de Grado). La Paz-Bolivia.

Villegas, N.P. Apoyo en Edición G. Jiménez & M. Gandarillas 2008. Los Recursos Naturales en Bolivia 1<sup>a</sup>. Edición. Cochabamba Bolivia.

Villegas, N.P. Apoyo en Edición G. Jiménez & M. Gandarillas 2008. Los Recursos Naturales en Bolivia 2<sup>a</sup>. Edición. Cochabamba Bolivia.

Wade, L.G. Jr., 2011. Química Orgánica. Volumen I. 7<sup>a</sup> edición, Editora G.B. López & J.D. Hernández, Estado de México

## ANEXOS

**Anexo A: NB 33013 - Productos Lácteos – leche cruda y fresca*****Requisitos fisicoquímicos de la leche***

Tabla 21.  
*Requisitos Fisicoquímicos aceptables de la leche*

<b>Leche cruda y fresca</b>	<b>Limite</b>	<b>Método de ensayo</b>
Acides titulable (ácido láctico %)	0.13 a 0.18	NB 229
Densidad a 20°C en g/ml	1.028 a 1.034	NB 230
pH a 20 °C	6.60 a 6.80	
Materia grasa en %	Minino 3.00	NB 228
Solidos no grasos en %	Mínimo 8.22	NB 706

Norma Boliviana NB33013. Productos lácteos – Leche cruda y fresca – Requisitos

***Nota***

Los resultados de análisis de laboratorios se expresarán en las cifras significativas expresadas en la norma.

**Requisitos de composición de la leche**

Tabla 22.  
*Requisitos de composición*

<b>Requisitos de composición</b>	<b>Limite</b>	<b>Método de ensayo</b>
Materia grasa (%)	Min. 3	NB 228
Proteínas (%)	Min. 3	NB 232
Lactosa (%)	Min. 4.50	
Cenizas (%)	Max. 0.70	NB 231:2
Solidos totales (%)	Min. 11.2	NB 231:1

Norma Boliviana NB 33013. Productos lácteos – Leche cruda y fresca – Requisitos

**Nota**

Los valores citados en la composición son referenciales que dependerán de varios factores ambientales, fisiológicos y genéticos.

**Requisitos microbiológicos de la leche**

La leche cruda y fresca debe cumplir con los siguientes requisitos:

Tabla 23.  
*Requisitos microbiológicos realizados a la leche cruda y fresca*

<b>Requisitos microbiológicos</b>	<b>Limite</b>	<b>Método de ensayo</b>
Recuento total bacterias mesófilas	$< 4 \times 10^6$ UFC/ml	NB 32003
Bacterias esporuladas	$< 1 \times 10^2$ UFC/ml	NB 914

Norma Boliviana NB33013. Productos lácteos – Leche cruda y fresca – Requisitos

## Anexo B: NB/NA 0078 - Leches fermentadas

### *Requisitos específicos*

Tabla 24.

#### *Requisitos específicos de las leches fermentadas*

<b>Especificación</b>	<b>Características</b>	<b>Detalles</b>
Aspectos homogéneos	El sabor, olor deben ser característicos del producto fresco, el color debe ser blanco cremoso u otro propio	Sin materias extrañas objetables
Adición de ingredientes lácteos	Crema pasteurizada, leche en polvo, leche evaporada, grasa láctea anhidrida, proteínas lácteas	Permitidos por la autoridad sanitaria competente de cada país
Suplentes	Además de los ingredientes indicados se puede añadir suero de leche	El mismo debe declararse en sus ingredientes
Insumos	Podrán añadirse: azúcar, edulcorantes, café, miel, chocolate, cacao.	El contenido máximo de cafeína será de 200 mg/kg en el producto final
Otros ingredientes	Hortalizas, frutas, pulpa de frutas, frutos secos, cereales y otros ingredientes de origen natural.	El contenido fruta debe estar de acuerdo a lo establecido en la legislación de cada país

Fuente: Norma Boliviana NB/NA 0078 (IBNORCA)

**Requisitos fisicoquímicos**

Tabla 25.

**Requisitos fisicoquímicos de la leche fermentada**

Requisitos	Tipo I		Tipo II		Tipo III		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	
Contenido de grasa % (fracción de masa) <sup>1</sup>							
Leche fermentada.	2.5	---	1.0	< 2.5	---	< 1.0	ISO 1211
Bebida láctea a base de leche fermentada.	1.25	---	0.50	< 1.25	---	< 0.5	ISO 2446
Acidez*, % (fracción de masa) <sup>1</sup>							
Yogur	0.6	1.5	0.6	1.5	0.6	1.5	
Leche cultivada	0.6	2.0	0.6	2.0	0.6	2.0	
Bebida láctea a base de leche fermentada.	0.3	1.5	0.3	1.5	0.3	1.5	ISO 11869
Proteína, % (fracción de masa) <sup>1</sup>							
En yogur, kéfir, kumis, leche cultivada	2.7	---	2.7	---	2.7	---	ISO 5542
Bebidas lácteas a base de leche fermentada	1.35	---	1.35	---	1.35	---	

(\*) Expresado como ácido láctico, (1) fracción de masa B W<sub>B</sub>, expresada en %, la notación % (m/m) no deberá usarse

***Cantidad de microorganismos específicos***

Tabla 26.

***Cantidad de microorganismos específicos***

<b>PRODUCTO</b>	<b>Mínimo<sup>1</sup></b>	<b>Mínimo<sup>2</sup></b>
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	$10^7$ UFC/g	----
Bacterias prebióticas	$10^6$ UFC/g	----
Levaduras		$10^4$ UFC/g

(<sup>1</sup>) productos como yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leche fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada. (<sup>2</sup>) para productos como kéfir y kumis.

### Anexo C: NB 707 - Leche y productos lácteos – Muestreo

Tabla 27.

*Plan de muestreo simple para inspección rigurosa de la leche cruda y fresca*

<b>Recolección para análisis</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Proceso</b>	<b>Norma</b>
		Deberá ser recolectada en jarras o vasos de acero inoxidable	
Organolépticos	Min. 250 ml		
		Deberá ser recolectada en frascos estériles debidamente selladas con tapas rojas	NB- ISO 707 NB-ISO 5538
Fisicoquímico	Min. 500 ml		
		Deberá ser recolectada en frascos estériles debidamente selladas con tapas blancas	
Microbiológico	Min. 200 ml		

Las muestras deberán ser transportadas en un cooler o refrigerador a una temperatura comprendida entre 2°C a 8°C.

**Anexo D: NB 887 - Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos**

Tabla 28.

*Principios adición de nutrientes esenciales a los alimentos*

<b>Adición de nutrientes esenciales</b>	<b>Condiciones</b>
<p><b>Restitución</b></p>	<p>Un alimento se considera fuente importante de un nutriente esencial, si contiene este nutriente en cantidades iguales o mayor al 10%</p>
<p><b>Equivalencia nutricional de alimentos sucedáneos</b></p>	<p>Se recomendará vivamente la equivalencia nutricional en términos de nutrientes esenciales de interés</p>
<p><b>Enriquecimiento</b></p>	<p>El alimento seleccionado como vehículo para el nutriente o los nutrientes esenciales deberán ser consumidos por la población expuesta a riesgo.</p>
<p><b>Asegurar la composición apropiada de nutrientes de un alimento para fines especiales</b></p>	<p>Podrá añadirse nutrientes a los alimentos para fines especiales, incluidos los alimentos para regímenes especiales, cuando se requiera asegurar un contenido apropiado y suficiente de nutrientes.</p>

Mantener o mejorar la calidad nutricional general de los alimentos

### Anexo E: ETD 33036 - Productos lácteos – Leches fermentadas con adición de nutrientes

Tabla 29.

*Requisitos fisicoquímicos con la adición de nutrientes*

Requisitos	Tipo I		Tipo II		Tipo III		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	
Contenido de grasa % (fracción de masa) <sup>1</sup>							
Leche fermentada.	1.75	---	0.7	< 1.75	---	< 0.7	NB 228
Acidez*, % (fracción de masa) <sup>1</sup>							
Yogur	0.45	1.5	0.45	1.5	0.45	1.5	NB 229
Proteína, % (fracción de masa) <sup>1</sup>							
En yogur	1.89	---	1.89	---	1.89	---	NB 232

No se permite la adición de grasas de origen vegetal o animal diferente a la láctea, excepto que provenga de los ingredientes adicionados.

Tabla 30.

*Requisitos microbiológicos con la adición de nutrientes*

Requisitos	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes totales, UFC/ml	5	10	100	2	NB 32005
Recuento de E. coli, UFC/g	5	< 1	-	0	NB 32005
Recuento de mohos y levaduras UFC/g	5	200	500	2	NB 32006

Cuando se analicen muestras individuales se tomarán como valores máximos los expresados en la columna m

## Anexo F: NB 22000 - Sistema de gestión de la inocuidad de alimentos

Tabla 31.

*HACCP del CODEX y las etapas de aplicación y cláusulas de la NB 22000*

<b>Principio del HACCP del CODEX</b>	<b>Etapas de aplicación del HACCP del CODEX</b>	<b>Norma NB 22000</b>
<b>Principio 1</b> Realizar un análisis de peligro	<b>Etapa 1:</b> Conformación del equipo HACCP	Equipo de inocuidad de los alimentos
	<b>Etapa 2:</b> Descripción del producto	Características de materias primas, materiales en contacto con el producto y control del producto terminado
	<b>Etapa 3:</b> Identificación del uso previsto	Uso previsto
	<b>Etapa 4:</b> Elaboración del diagrama de flujo.	Diagramas de flujo y descripción de los procesos
	<b>Etapa 5:</b> Confirmación del diagrama de flujo	
	<b>Etapa 6:</b> Enumeración de todos los productos potenciales.	Análisis de peligros
	Llevar a cabo un análisis de peligros	Validación de las medida o control y combinaciones de medidas de control
	Considerar las medidas de control	

Sistema de gestión de la inocuidad de los alimentos-requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria

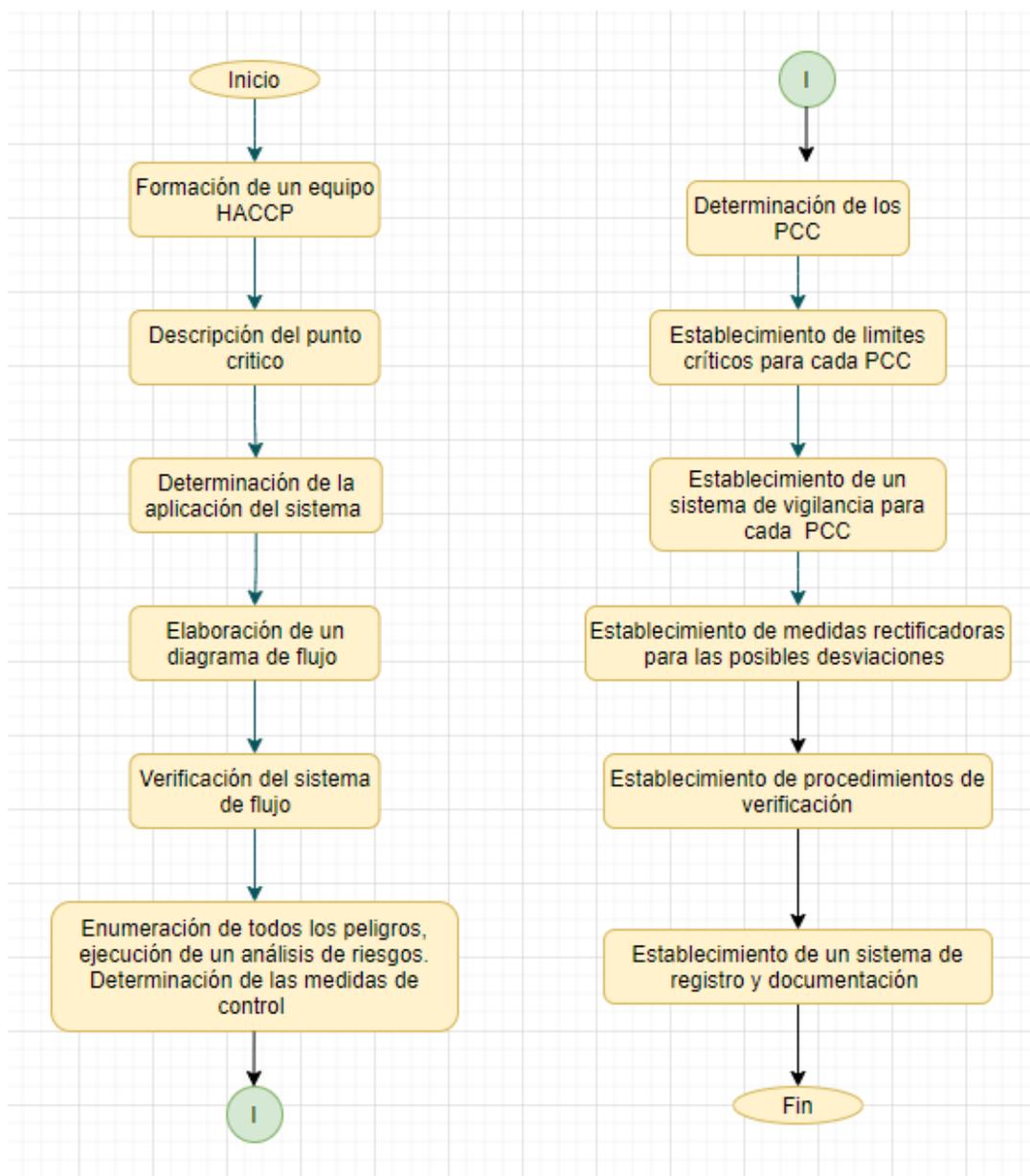
Tabla 31- 1. (Continuación)

<b>Principio del HACCP del CODEX</b>	<b>Etapas de aplicación del HACCP del CODEX</b>	<b>Norma NB 22000</b>
<b>Principio 2</b> Determinar los puntos críticos de control PCC.	<b>Etapa 7:</b> Determinación de los PCC.	Plan de control de peligros.
<b>Principio 3</b> Establecer límites críticos.	<b>Etapa 8:</b> Establecimiento de los límites críticos para cada PCC.	Plan de control de peligros.
<b>Principios 4</b> Establecer un sistema de vigilancia para el control de PCC.	<b>Etapa 9:</b> Establecimiento de un sistema de vigilancia para cada PCC.	Sistema de seguimiento en los PCC y para los PPRO
<b>Principio 5</b> Establecer las medidas correctivas que ande adoptarse, cuando la vigilancia indica que un determinado PCC no está controlado	<b>Etapa 10:</b> Establecimiento de las medidas correctivas.	Plan de control de peligros, correcciones y acciones correctivas.
<b>Principio 6</b> Establecer procedimientos de aprobación para confirmar que el sistema HACCP funciona eficazmente	<b>Etapa 11:</b> Establecimiento de procedimientos de comparación.	Control de seguimiento y la medición. Verificación relacionada con los PPR y el plan de control de peligros. Auditoria interna
<b>Principio 7</b> Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros apropiados para estos principios y su aplicación	<b>Etapa 12:</b> establecimiento de un sistema de documentación y registro	Información documentada

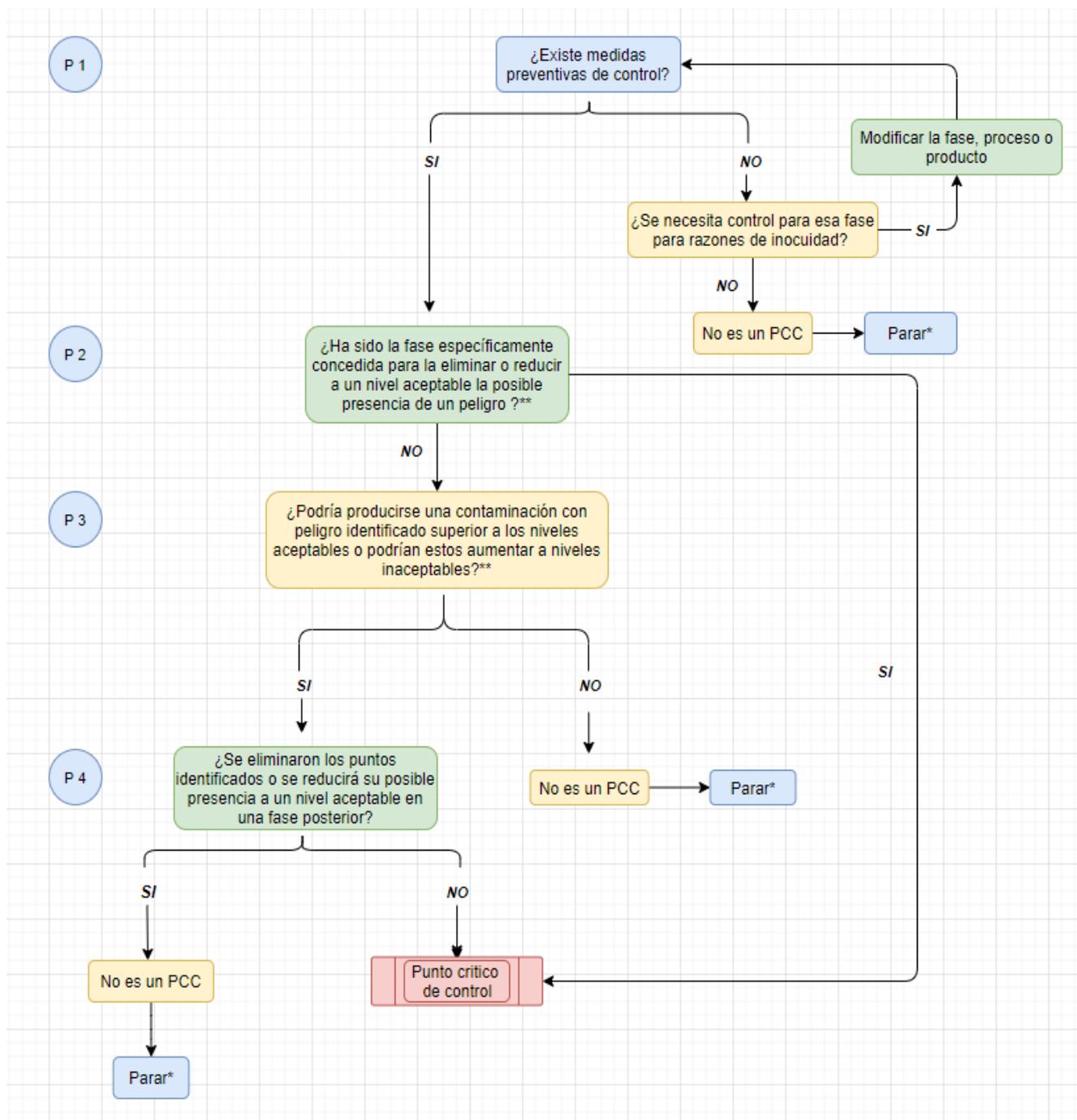
Sistema de gestión de la inocuidad de los alimentos-requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria

**Anexo G: NB 855 - Principios generales de higiene de los alimentos**

Código de prácticas – Principios generales de la higiene de los alimentos.

*Flujograma 9. Secuencia lógica para la aplicación del sistema de HACCP*

Flujograma 10. Ejemplo de una secuencia de decisiones para identificar los PCC



(\*) Pasar al siguiente peligro identificado del proceso descrito

(\*\*) Los niveles aceptables o inaceptables necesitan ser definidos teniendo en cuenta los objetivos globales cuando se identifican los PCC de los HACCP

## Anexo H: NB 41001 – Envases y Embalajes

Tabla 32.  
Manual de normas de calidad de envase y empaque

<b>CARACTERIZACIÓN</b>		
Descripción	Lámina flexible en base a Polietileno de Baja Densidad (PEBD). PEBD Blanco / PEBD Oscuro / Cristal.	
<b>ALMACENAMIENTO</b>		
Temperatura	Temperatura Ambiente. No exponer directa o indirectamente al sol	
Embalaje	Se deberán apilar 6 bobinas como máximo, durante el tiempo de almacenaje.	
Humedad	Ambiente fresco, seco y ventilado	
Manipulación *	Cuidado de no debilitar el envase y ocasionar problemas rupturas o fisuras que dañen la bobina	
<b>ESPECIFICACIONES</b>		
	<b>Dimensiones</b>	<b>Estándar</b>
	Ancho (mm)	$320 \pm 3$
	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	$100.0 \pm 5.0$
	Distancia entre taca (mm)	$95 \pm 1$
	Impresión	Ver diseño de arte
	Calidad de impresión	Ver diseño de arte
<b>MUESTREO Y ACEPTACIÓN</b>		
El muestreo será efectuado acorde a NB/ISO 2859-1		
<b>Características de aceptación</b>		
<b>Características del rotulado</b>		
a. Nombre de la Lámina		
b. Fecha de producción		
c. Razón social del fabricante		
d. Número de registro sanitario del fabricante		
e. Número de Rollo		
f. Número de lote		
g. Peso		
h. Certificado de calidad del proveedor		
<b>Características de Muestreo</b>		
Ancho		
Espesor		
Distancia entre tacas		
Calidad de impresión		
Prueba de Peróxido		

Tabla 29- 1.continuación

<b>Formulación</b>	<p>En la prueba de maquinabilidad, la película debe presentar: Buen deslizamiento en los rodillos de la envasadora y conformador (la lámina no debe pegarse en los rodillos ni en las partes de la cabina dado que trabajara a una temperatura de 45 ° C).</p> <p>Buenas condiciones de sellado, horizontal y vertical</p> <p>La capa interna, en contacto con el producto debe de ser natural y sin aditivos.</p> <p>Es deseable que el producto sea extruido en tres capas, con capa intermedia oscura, para obtener un color oscuro, el cual proteja al producto de los rayos del sol.</p>
<b>Presentación</b>	<p>Envase Interno: Bolsa de polietileno doble capa o caja de cartón</p> <p>Cada bobina debe de tener un peso neto de: (Mínimo 17.5 kg - Máximo 23.0 kg)</p> <p>Cada bobina debe de poseer identificación en la envoltura de empaque: peso, fecha de producción, lote, n° de rollo.</p> <p>Cono interior de plástico o cartón de 3 pulgadas de diámetro.</p>
<b>Lámina</b>	<p>La lámina debe ser homogéneo y no debe tener defectos como arrugas, "ojos de pez", agujeros, sustancias extrañas o quemadas</p> <p>Los rollos no deben tener cortes u otros defectos como golpes o degradación de color por fallas de impresión o abrasión.</p>
<b>Color</b>	<p>Completamente definidos según la tonalidad presentada en el diseño de arte.</p> <p>La impresión no debe de sufrir alteraciones al contacto con agua clorada.</p> <p>Las pinturas utilizadas deben de ser resistentes al Ácido Láctico y peróxido de hidrogeno.</p>

Todos los materiales deben tener aprobación para contacto con alimentos

**Anexo I: NB 314004 – Etiquetado nutricional**

Tabla 33.  
*Contenido nutricional de etiquetas presentación vertical*

<b>Información nutricional</b>			
Porción {peso/unidad} (medida casera)			
Porción por envase: {valor}			
	Cantidad por porción	Cantidad por 100g	% VRN (*)
Valor energético	Kcal(kJ)	Kcal(KJ)	0
carbohidratos	0,0 g	0,0 g	0
Proteínas	0,0 g	0,0 g	0
Grasas totales	0,0 g	0,0 g	0
Fibra alimentaria	0,0 g	0,0 g	0
Sodio	0,0 mg	0,0 mg	0

(\*)% valores referenciales nutricionales con base a una dieta de 2 000kcal y 8.40J.  
Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas

Tabla 34.  
*Contenido nutricional de etiquetas presentación horizontal*

<b>Información</b>	Cantidad por porción		% VRN	Cantidad por porción		% VRN
<b>nutricional</b>	Valor energético	Kcal (0 kJ)	0	Grasa saturada	0 g	0
Porción	carbohidratos	0 g	0	Grasas Trans	0 g	0
{ peso/unidad }	Proteínas	0,0 g	0	Fibra alimentaria	0 g	0
(medida casera)	Grasas totales	0 g	0	Sodio	0 g	0

(\*)% valores referenciales nutricionales con base a una dieta de 2 000kcal y 8.40J. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas

