

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“FLÓCULOS PRESENTES EN JARABE DE AGAVE:
CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL
ORIGEN DE SUS COMPONENTES”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA
MARCELA DE LA MORA AMUTIO**

**DIRECTOR
DR. TETSUYA OGURA FUJII**

**CODIRECTOR
DR. BENJAMÍN VALDEZ SALAS**

Mexicali, B. C.

Noviembre de 2014

INDICE

AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. Justificación Y Uso De Los Resultados	11
OBJETIVOS	12
1. Objetivo General.....	12
2. Objetivos Particulares.....	12
HIPÓTESIS	12
ANTECEDENTES	13
1. Importancia De Los Jarabes Ricos En Fructosa.....	13
2. <i>Agave Tequilana</i> Weber Var. Azul Y Su Importancia Como Cultivo En México 15	
3. Producción De Jarabe De Agave	17
3.1 Fenómeno De Aparición De Las Partículas	19
METODOLOGÍA	22
1. Aislamiento	22
1.1. Observación Y Características Los Flóculos Del Jarabe	22
1.2 Aislamiento Por Centrifugación (F1)	22
1.3 Aislamiento Por Filtración (F2).....	22
1.4 Aislamiento Con Etanol (F3)	23
2. Estructura General E Identificación De Componentes	24
2.1 Determinación General De Composición Por Espectrofotometría De Infrarrojo Con Transformadas De Fourier (Ft-Ir)	24
2.2. Contenido De Agua Y Humedad.....	24
2.3 Determinación De Carbohidratos Por Cromatografía De Capa Fina (Tlc)	25
2.4. Determinación De Azúcares Reductores Por El Método Del Ácido 3,5 Dinitrosalicílico (Dns)	25
2.5. Extracción De Componentes Por Rango De Polaridad.....	26
2.6. Hidrólisis De Los Flóculos.....	29
2.7. Determinación De Ácido Galacturónico (Pectina).....	30

2.8 Análisis De Los Extractos Por Ft-Ir	31
2.9 Análisis Por Microscopia Electrónica De Barrido Y Espectroscopia Dispersante de Rayos X (Sem/Eds)	31
2.10 Contenido De Cenizas En FI1 Y FI2	32
2.11 Determinación De Sílice En Los Flóculos Por Colorimetría Con Molibdato De Amonio	32
2.12 Determinación De Calcio Por Espectrofotometría De Absorción Atómica ..	32
2.13 Cuantificación De Concentración De Los Flóculos En El Jarabe Por Precipitación Con Azul De Toluidina.....	33
RESULTADOS	34
1. Aislamiento: Observación Y Características Físicas De Los Flóculos Del Jarabe	34
2. Purificación Y Cuantificación.....	36
2.1 Por Centrifugación (FI1).....	36
2.2 Por Filtración (FI2)	37
2.3 Por Precipitación Con Etanol (FI3).....	37
3. Humedad Y Contenido De Agua.....	38
3.1 Contenido De Agua En FI1	38
3.2 Humedad En FI2 Y FI3.....	38
4. Determinación De Pectina	39
5. Extracción De Componentes Por Rango De Polaridad.....	39
6. Contenido De Cenizas	40
7. Caracterización De Flóculos Purificados Y Sus Extractos Mediante Espectrofotometría De Infrarrojos (Ft-Ir)	41
7.1 Flóculos Purificados.....	41
7.2 Extractos De Flóculos FI1	44
7.3 Cenizas De Los Flóculos	50
8. Determinación De Sílice.....	52
8.1 En Los Flóculos	52
8.2 En Jugo De Agave.....	53
8.3 En Agua De Proceso	53
9. Determinación De Calcio	55
10. Caracterización De Los Flóculos Por Cromatografía De Capa Fina (Tlc)	55

10.1 Hidrólisis Enzimática.....	57
10.2 Hidrólisis Ácida	61
11. Análisis Por Microscopía Electrónica De Barrido Y Espectroscopia Dispersante de Rayos X (Sem/Eds).....	64
11.1 Lámina Blanca De FI1 Y FI2	64
11.2 Residuo De Extracciones Con Solventes	66
12. Cuantificación De Concentración Por Precipitación Con Azul De Toluidina	67
DISCUSIONES	70
1. Aislamiento: Observación Y Características Físicas De Los Flóculos Del Jarabe	70
2. Purificación Y Cuantificación.....	72
3. Determinación De Pectina	74
4. Contenido De Cenizas En FI1 Y FI2.....	75
5. Caracterización De Flóculos Purificados Y Sus Extractos Mediante Espectrofotometría De Infrarrojos (Ft-Ir)	75
5.1 Extractos De Flóculos FI1	76
6. Contenido De Sílice Y Calcio	78
6.1 Sílice En Agua De Pozo Y Jugo	80
7. Caracterización De Los Flóculos Por Cromatografía De Capa Fina (Tlc)	80
7.1 Hidrólisis Enzimática.....	80
7.2 Hidrólisis Ácida	81
8. Caracterización De Los Flóculos Por Microscopia Electrónica De Barrido Y Espectroscopia Dispersante de Rayos X (Sem/Eds)	82
8.1 Lámina Blanca De FI1 Y FI2	82
8.2 Fracción Final Insoluble	83
9. Cuantificación De Concentración Por Precipitación Con Azul De Toluidina	84
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	86

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Diagrama General de proceso de producción de jarabe de agave.	18
Figura 2. Muestra de jarabe con numerosos flóculos (círculos blancos).	20
Figura 3. Diagrama de extracción de componentes de FL1	28
Figura 4. Flóculos de jarabe teñidos (a): con solución de yodo 1N (100X); (b): con azul de toluidina (100X); (c): con azul de metileno (400X).	34
Figura 5. Flóculo teñido con yodo 1N y observado en microscopio óptico de contraste de fases.	35
Figura 6. FL1 homogenizado.	36
Figura 7. Proceso de obtención de FL2 a partir de jarabe con flóculos.	37
Figura 8. Flóculos secos obtenidos de jarabe por precipitación con etanol.	38
Figura 9. Espectro de FL1	41
Figura 10. Espectro de infrarrojo de FL2.	42
Figura 11. Espectro de infrarrojo de FL2 (azul) y FL1 (negro).....	43
Figura 12. Espectro de infrarrojo de FL3.	44
Figura 13. Extracto de FL1 soluble en cloroformo.	45
Figura 14. Extractos de butanol (rojo) e IPA (Negro).....	46
Figura 15. Extracto de butanol (rojo) y fructosa grado reactivo (azul)	47
Figura 16. a. Lámina blanca. b. Fotografía en microscopio óptico compuesto aumento 100X	47
Figura 17. Espectro de lámina blanca de FL1.	48
Figura 18. Espectro del extracto soluble en agua de FL1.	49
Figura 19. Extracto acuoso de FL1 (verde) y residuo de extracciones insoluble en agua (negro).	50
Figura 20. Negro: Sílica gel tipo 60 (Merck); Rojo: FL1; azul: FL2	51
Figura 21. Azul: sílica gel (Merck); rojo: FL1; verde: FL2.	52
Figura 22. Concentración de sílice en las muestras de agua de proceso.	54
Figura 23. (a) Patrón cromatográfico de los flóculos antes de ser hidrolizados; (b) patrón cromatográfico de diferentes carbohidratos.	56
Figura 24. Perfil cromatográfico del extracto de butanol de FL1 que muestra monómeros y oligómeros de fructosa.	57
Figura 25. Hidrólisis con mezcla de diferentes enzimas: hemicelulasa, laminarinasa, pectinasa, celulasa e inulinasa.	58
Figura 26. Hidrólisis de FL3 con diferentes enzimas	60
Figura 27. Perfil cromatográfico de las enzimas utilizadas para la hidrólisis de los flóculos.	61
Figura 28. Cromatoplaqueta de la hidrólisis ácida de las láminas blancas de FL1 y FL2.	63
Figura 29. Micrografías de la superficie de la lámina de FL1.	65
Figura 30. Micrografías de la superficie de la lámina de FL2.	65

Figura 31. Micrografías de la superficie del residuo insoluble de las extracciones de FL1.	66
Figura 32. Formación del complejo flóculo-azul de toluidina en un jarabe que contiene flóculos.....	68
Figura 33. Formación del complejo flóculo-azul de toluidina en un jarabe que contiene flóculos.....	69
Figura 34. Estructura química del azul de toluidina y del azul de metileno	70
Figura 35. Partículas de FL1 teñidas con azul de toluidina	72
Figura 36. Partículas de FL2 teñido con azul de toluidina.	73
Figura 37. Imagen de sílice por SEM. Tomado de (Thakur 2010).	82
Tabla 1. Preparación de las muestras para análisis por DNS.....	26
Tabla 2. Enzimas utilizadas para la hidrólisis de los flóculos.....	30
Tabla 3. Preparación de muestras para cuantificación de flóculos.	33
Tabla 4. Extractos de FL1 realizados con diferentes solventes en rango de polaridad ascendente.....	39
Tabla 5. Contenido de cenizas en las muestras de FL1 y FL2	40
Tabla 6. Concentración de sílice en los flóculos.	53
Tabla 7. Concentración de calcio en los flóculos	55
Tabla 8. Cuantificación de hidrólisis enzimática de FL1, FL2 y FL3.	60
Tabla 9. Porcentaje de azúcares reductores (AR) en los flóculos antes y después de la hidrólisis ácida.....	62

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que hicieron posible la realización de este trabajo:

Al equipo de la UABC por aceptarme en su programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería: Dr. Benjamín, Dra. Mónica y al Dr. Mario por su ayuda con los análisis en el microscopio de fuerza atómica y el electrónico de barrido.

A la Empresa Inulina y Miel de Agave SA de CV por el financiamiento de esta investigación.

A mis tutores el Dr. Ogura, el Dr. Benjamín y la Dra. Julia por todo su apoyo, su guía y sus consejos.

A Rodrigo, y a toda mi familia por motivarme y apoyarme en esta etapa.

A mis compañeros del laboratorio por toda su ayuda y su amistad.

Al CONACYT, por la beca otorgada para el estudio de este posgrado.

RESUMEN

La fructosa se ha convertido en el endulzante con mayor demanda tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica, siendo el maíz la principal fuente de este sacárido. Muchos estudios se han realizado desde hace varias décadas con el fin de producir jarabes altos en fructosa a partir de fuentes alternativas al maíz, como el dátil, así como de vegetales que contienen fructanos del tipo de la inulina: alcachofa, chicoria y agave. El continuo crecimiento de la nueva industria de jarabe de agave ha traído consigo nuevos retos y problemas sin precedentes en sus procesos de producción, siendo uno de ellos la formación de flóculos en el producto terminado en la empresa Inulina y Miel de Agave S.A. de C.V., el cual provoca rechazo del producto por parte del cliente y pérdidas económicas importantes. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición de estos flóculos y el origen de sus componentes para recomendar medidas correctivas y preventivas a este problema. Encontramos que los flóculos están compuestos principalmente por oligómeros de fructosa, glucanos, pectina, calcio y sílice. El sílice parece comportarse como punto de unión entre los demás componentes de los flóculos, convirtiéndolo en un factor determinante para su formación. Los resultados indican que el sílice en los flóculos proviene del agua utilizada para el proceso de producción del jarabe.

ABSTRACT

Fructose has become the sweetener of greater demand among food and pharmaceutical industry, being maize the main source of this saccharide. Many studies have been conducted for several decades in order to produce high fructose syrups from alternative sources to maize as the date palm and vegetables containing inulin type fructans: artichoke, chicory and agave. The continuous growth of the new agave syrup industry has brought new challenges and problems without precedents in their production processes, one being floc formation in the finished product, causing rejection of the product by the customer along with significant economic losses. The aim of this study was to determine the composition of these flocs and the origin of its components to recommend adequate corrective and preventive measures to this problem. We found that the floccules are mainly composed by fructose oligomers, glycans, pectin, calcium and silica present in the syrup as colloids. Silica seems to be a determining factor in floc formation because it functions as a binder to agglomerate the rest of its components. Silica has its origin in the water used for the syrup production process.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los jarabes ricos en fructosa son mucho más preferidos como aditivos en alimentos y bebidas que aquellos ricos en sacarosa pues poseen propiedades que la hacen más atractiva y funcional, como una mayor dulzura respecto a la sacarosa, mayor solubilidad en agua y etanol, mayor capacidad higroscópica, menor potencial cariogénico, asimilación independiente de la, así como su participación en la absorción de hierro. Muchos estudios se han realizado desde hace varias décadas con el fin de producir jarabes altos en fructosa a partir de fuentes alternativas al maíz, como el agave tequilero, que contiene fructanos del tipo de la inulina, debido a que el rendimiento producción de fructosa de inulina es cercano al 95%, mientras que en maíz es del 42%. El jarabe de agave es un endulzante líquido alto en fructosa producido a partir de la hidrólisis del jugo de agave (*Agave tequilana* Weber. Var *azul*) extraído del tallo (piña) de la planta. Dicho jugo está compuesto de fructanos (polímeros de fructosa), los cuales constituyen los polisacáridos de reserva de la planta. La nueva industria del jarabe o miel de agave ha mostrado un crecimiento muy interesante debido al incremento en la demanda y producción de jarabe. Con dicho crecimiento se presentan nuevos problemas y retos a superar que difícilmente tendrán antecedentes sobre los cuales apoyarse para encontrar la solución. En esta tesis se aborda el caso práctico en la empresa Inulina y Miel de Agave S.A. de C.V. (IMAG), en la que se ha estado observando la presencia de flóculos en el jarabe, los cuales se forman y se visualizan después de 30 días de almacenamiento del producto terminado. Estos flóculos tienen una apariencia viscosa mucoide y blanquecina, los cuales al formarse se encuentran

suspendidos y después de cierto tiempo precipitan al fondo del recipiente. Aunque la presencia de dichos flóculos no altera la composición ni propiedades del jarabe, la apariencia del producto está provocando el rechazo por parte de los clientes, lo cual representa pérdidas económicas importantes para el productor. El objetivo de esta investigación fue la caracterización, la determinación de sus componentes y el origen de los mismos, con la finalidad de conocer los factores que determinan su formación y generar medidas de control y técnicas de diagnóstico temprano que eviten posteriores pérdidas económicas al productor.

1. JUSTIFICACIÓN Y USO DE LOS RESULTADOS

La presencia de estos flóculos en el jarabe ha provocado pérdidas económicas que ascienden a cerca de \$250,000 USD para la empresa Inulina y Miel de Agave S.A. de C.V. debido a la devolución del producto por parte de los clientes. Por lo anterior, fue prioritaria la investigación enfocada al conocimiento de la composición de los flóculos, los factores críticos de su presencia y el origen de sus componentes, para generar estrategias de control preventivo y correctivo al problema.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición de los flóculos presentes en el jarabe de agave, el origen de dichos componentes y los factores críticos que desencadenan su aparición.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y purificar las partículas de jarabe
2. Caracterizar fisicoquímicamente las partículas del jarabe mediante pruebas de tinción, solubilidad, hidrólisis, cuantificación de azúcares reductores.
3. Identificar el tipo de estructura general y componentes principales de las partículas mediante espectrofotometría UV-VIS, infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR), cromatografía de capa fina (TLC), espectrometría de absorción atómica y microscopía electrónica de barrido.

HIPÓTESIS

Los flóculos están formados por una mezcla de compuestos de origen vegetal que se encuentran de forma coloidal en el jarabe, los cuales a través del tiempo colisionan entre sí hasta formar flóculos que incrementan su densidad y finalmente precipitan al fondo del contenedor.

ANTECEDENTES

1. IMPORTANCIA DE LOS JARABES RICOS EN FRUCTOSA

La fructosa se ha convertido en el tipo de endulzante con mayor demanda tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica (Montañez Soto et al. 2011; Barclay et al. 2012) pues en comparación con la sacarosa, posee propiedades que la hacen más atractiva y funcional, como una mayor dulzura, mayor solubilidad en agua y etanol, menor potencial cariogénico, asimilación independiente de la insulina, lo que permite a los diabéticos consumir este tipo de jarabes, así como su participación en la absorción de hierro (Fleming and GrootWassink 1979; Henry, Crapo, and Thorburn 1991; Schved and Hassidov 2008).

El jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) se ha convertido en el más importante sustituto y competidor del consumo de azúcar refinado debido a sus propiedades físicas y bajo precio respecto al azúcar. Como sucede en otros países, en México también se ha incrementado el consumo de jarabes altos en fructosa. El JMAF se utiliza principalmente en la fabricación de bebidas, productos lácteos, confitería y repostería, y como almíbar en frutas enlatadas. Los principales consumidores del JMAF en México son las empresas embotelladoras de refrescos, que iniciaron su consumo de forma regular y creciente para sustituir el azúcar desde 1995. El promedio del consumo nacional de JMAF en los últimos 3 años fue de más de un millón de toneladas anuales, de las cuales, el 70% fue importada principalmente a EUA y solamente el 30% se produjo en el país (CONADESUCA 2013). Durante este año la sobreproducción nacional e internacional del azúcar y su consecuente efecto en los niveles de precios, han provocado que el crecimiento del

consumo del JAFM se haya detenido, pues prácticamente se igualaron los precios de ambos edulcorantes (CEDRSSA 2014). Sin embargo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico junto con la FAO (OECD-FAO) proyecta un incremento tanto en la producción como en el consumo de fructosa de alrededor del 28% para 2023, permaneciendo EUA como líder productor seguido de la Unión Europea, y siendo China y México los principales consumidores, incrementando para este último, tanto las importaciones como el consumo como parte del tratado de libre comercio (TLC) (OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014).

Además del maíz, es posible producir jarabes de alta fructosa a partir de fuentes alternativas (Ricca et al. 2007; Chi et al. 2009), por lo que desde hace varias décadas se han realizado investigaciones de producción de jarabes ricos en fructosa a partir del dátil (Chaira et al. 2011) y otras plantas que almacenan polímeros de fructosa (fructanos de inulina) como la alcachofa (*Helianthus tuberosus L.*), (Fleming and GrootWassink 1979; Kim and Rhee 1989), la chicoria (Zittan 1981; Baston and Neagu 2013) y el agave (Zuniga Partida, et al. 1998; Michel-Cuello et al. 2012).

Una gran ventaja de los jarabes de alta fructosa producidos a partir de fructanos de inulina sobre los producidos a partir de almidón de maíz consiste en que el rendimiento de fructosa obtenida a partir de inulina es cercano al 95%, mientras el rendimiento a partir de maíz es solamente del 42% (Zittan, 1981; Kim y Rhee, 1989), por lo que es necesaria la isomerización enzimática de la glucosa hacia fructosa para producir JMAF (Sivasankar 2002).

Como se mencionó anteriormente, es posible producir jarabe rico en fructosa a partir de diferentes especies de *Agave* como *A. salmiana* y *A. tequilana* weber var. Azul, pues el tallo o “piña” puede acumular hasta un 25% de su peso en forma de fructanos de inulina (Iñiguez-Covarrubias et al. 2001; Legorreta Peyton and Ogura Fujii 2002), con rendimientos de hasta 96.4% de fructosa después de la hidrólisis de los fructanos (Michel-Cuello et al. 2012).

2. AGAVE TEQUILANA WEBER VAR. AZUL Y SU IMPORTANCIA COMO CULTIVO EN MÉXICO

El género *Agave* tiene una relación milenaria con la historia de México, y ha sido aprovechado en un amplio rango de aplicaciones, desde alimento hasta medicina, en cultos religiosos, aplicaciones textiles, de construcción e incluso como ornamentales (García-Herrera, Méndez-Gallegos, and Talavera-Magaña 2010). El género pertenece a un grupo de plantas monocotiledóneas de la familia de las Agaváceas, y más de 200 especies además de 47 categorías infraespecíficas han sido identificadas, de las cuales el 75% se encuentran en el territorio mexicano, siendo alrededor de 135 especies endémicas de México (Nobel 2003).

Durante su desarrollo, la planta sintetiza y acumula carbohidratos de reserva en la piña que consisten en fructanos del tipo de la inulina (E. Mellado-Mojica and López- Pérez 2013; Lopez, Mancilla-Margalli, and Mendoza-Diaz 2003). La inulina de *A. tequilana* Weber var. *Azul* consiste en una compleja mezcla de fructooligosacáridos que contienen principalmente enlaces β (2-1) pero también β (2-6) –del tipo de los levanos- con ramificaciones y glucosas terminales e internas (López et al., 2003), por lo podríamos decir que es un polímero del tipo “inulina-

levano". Su rango de polimerización oscila entre 3 y 50 unidades de fructosa, con un promedio de 30. Por su particular estructura, es altamente soluble en agua, pudiendo preparar soluciones de hasta 80°Bx, lo que permite una amplia gama de aplicaciones en la industria alimenticia (Ogura and Kojima 2007).

La planta alcanza su madurez en un período de entre 6 y 10 años, cuando se produce la inflorescencia. Sin embargo, para los productores es de crucial importancia cosechar la planta antes de que eso suceda, pues la inflorescencia consume los fructanos de la piña hasta que la planta finalmente muere (Valenzuela-Sánchez et al. 2006).

Los usos que se le ha dado al agave incluyen la producción de bebidas alcohólicas como el mezcal (*A. angustifolia*; *A. potatorum*; *A. salmiana*), el Sotol (*A. dasylirion*; *Dasylirion* ssp.), la Bacanora (*A. angustifolia*; *A. potatorum*; *A. pacifica*), el Pulque (*A. salmiana*) y el Tequila (*A. tequilana*). El aguamiel o el jugo obtenidos de los tallos o "piñas", se utilizan para obtención de polisacáridos, fructanos, combustibles y jarabes altos en fructosa (Narváez-Zapata and Sánchez-Teyer 2009), pero sin duda, hasta el día de hoy *A. tequilana* es la especie de agave con mayor importancia en nuestro país debido a que genera ingresos anuales cercanos a los mil millones de dólares anuales por la exportación de tequila (2013) y cerca de 240 millones de dólares de enero a marzo de 2014, que después de la cerveza, es la bebida nacional de mayor exportación (SAGARPA, 2014).

Un problema grave en la industria tequilera ha sido el desorden en la cadena productiva agave-tequila, que genera ciclos de escasez-abundancia de agave, provocando alzas y bajas extremas en el precio de la piña (Universidad de Guadalajara 2013). Debido a lo anterior y al descubrimiento de las propiedades y

beneficios del consumo de inulina de agave, surgió el interés de aprovechar *A. tequilana* para fabricación de productos alternativos como inulina y jarabe alto en fructosa.

En la actualidad existen más de 12 plantas productoras de inulina y jarabe de agave que generan cerca de 13 millones de dólares anuales, y se espera un constante crecimiento de dicha industria en los próximos años (López, 2013). En las industrias en desarrollo, el crecimiento implica nuevos problemas y retos, como es el caso de la empresa Inulina y Miel de Agave S.A. de C.V., la cual ha tenido un notable crecimiento desde su formación en 2005 hasta la fecha, pues de comenzar con 10 empleados, ahora cuenta con 145. Este incremento en el número de empleados es un reflejo del aumento de su producción y ventas de jarabe e inulina.

3. PRODUCCIÓN DE JARABE DE AGAVE

Los reportes de producción de jarabe de agave se enfocan principalmente en la hidrólisis enzimática de sus fructanos, como lo es el caso del jarabe de *Agave salmiana* (Michel-Cuello et al. 2012), en el que se reportan rendimientos de fructosa del 77 al 96.4% del total de los azúcares reductores obtenidos. También hay algunos estudios que muestran la efectividad de la hidrólisis térmica y ácida de los fructanos de agave para la obtención de alrededor del 80% de fructosa en el total de los azúcares reductores (Waleckx et al. 2008; Villegas-Silva et al. 2014).

El proceso de producción de jarabe de agave consiste en lo siguiente: desgarre de las piñas de 6.5 - 7 años de edad, extracción del jugo (rico en inulina) de las fibras mediante un difusor a una temperatura de entre 60 y 70 °C, -en este punto, diferentes compuestos son extraídos hacia el jugo, los cuales son mayormente

eliminados durante el proceso de hidrólisis de la inulina- posteriormente el tratamiento con carbón activado, tratamiento con resina de intercambio catiónico, hidrólisis ácida de la inulina en el jugo (min. 98% de azúcares reductores), tratamiento con carbón activado y resinas de intercambio aniónico, y finalmente la evaporación del agua para alcanzar una concentración final de fructosa de 70-75°Brix (Figura 1). Este proceso de desmineralización del jarabe mediante el uso de resinas de intercambio iónico ha sido reportado anteriormente para producción de jarabe glucosa y fructosa a partir de almidón de maíz (Hinman & Nelson, 1974; Hui, 2007).

Para la extracción del jugo en el proceso de producción del jarabe de agave, las piñas son desgarradas en un extrusor y posteriormente el jugo se extrae en un difusor utilizando agua a temperaturas cercanas a los 60°C.

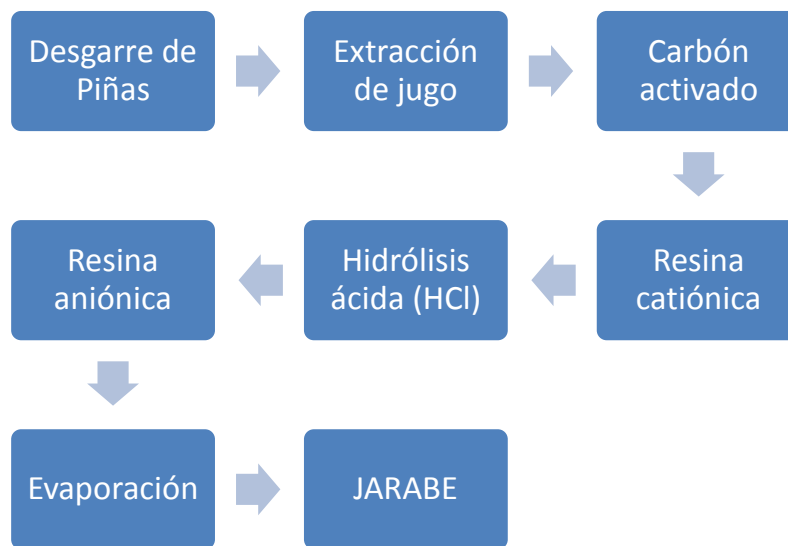


Figura 1. Diagrama General de proceso de producción de jarabe de agave.

3.1 FENÓMENO DE APARICIÓN DE LAS PARTÍCULAS

Con el incremento en la demanda y producción de jarabe de agave desde 2011 se ha notado en ciertos lotes, la presencia de flóculos suspendidos y precipitados en el producto final, haciéndose particularmente notorias en botellas de cristal y alterando de manera negativa la apariencia y consistencia del jarabe, lo que provoca su rechazo por parte del cliente y pérdidas económicas importantes para el productor.

Al término de la producción del jarabe, se obtiene un líquido cristalino color ámbar. El proceso de formación de los flóculos en el jarabe sucede en un lapso de 30-40 días a partir de su producción. Los 10 primeros días el jarabe se observa cristalino, con el paso del tiempo la turbidez se incrementa y al cabo de 20-25 días se observan pequeños flóculos suspendidos en el jarabe que incrementan su tamaño y densidad de forma gradual hasta que precipitan al fondo, quedando nuevamente cristalino el jarabe (Figura 2).

De acuerdo con publicaciones anteriores, la aparición de una especie de niebla en jarabes de glucosa puede ser provocada principalmente por minerales como sulfatos, sales de calcio y a una hidrólisis incompleta del almidón, que al tener baja solubilidad precipitan generando turbidez en el jarabe (Hull 2011). Por lo anterior, el proceso de desmineralización del jugo es un punto clave en la producción del jarabe.

A pesar de los numerosos puntos de control a lo largo del proceso de producción con el fin de garantizar la uniformidad y calidad del producto en cada lote de producción, solamente el valor de turbidez del jugo ha podido correlacionarse con la futura formación de los flóculos. Tanto los lotes que no presentan flóculos como los

que sí los presentan, muestran valores de turbidez dentro del rango de aceptación en los parámetros evaluados (Comunicación Personal IMAG).

Hasta ahora no se han encontrado reportes sobre la aparición de este tipo de flóculos en otros jarabes o mieles altos en fructosa, así como tampoco en jarabes de agave debido a que se trata de una industria de reciente creación.

Análisis preliminares en el laboratorio mostraron que las partículas se disuelven al agitar el jarabe y calentarlo a una temperatura mínima de 60°C, volviendo a obtener un producto cristalino. Sin embargo, las partículas vuelven a formarse después de 20 - 30 días de la misma forma descrita previamente.



Figura 2. Muestra de jarabe con numerosos flóculos (círculos blancos).

Desde el inicio se descartó la posibilidad de que las partículas se traten del micelio de algún hongo, debido a que desaparecen cuando se eleva la temperatura del jarabe y se agita. Se realizaron pruebas microbiológicas de los flóculos para detectar la presencia de bacterias sacarofílicas pero fueron negativas.

Debido a que no se han encontrado reportes de la presencia de este tipo de flóculos en jarabes o mieles, las características observadas en los flóculos del jarabe durante las pruebas nos fueron marcando las pautas para determinar la composición de los mismos.

METODOLOGÍA

1. AISLAMIENTO

1.1. OBSERVACIÓN Y CARACTERÍSTICAS LOS FLÓCULOS DEL JARABE

Con una pipeta Pasteur se tomaron flóculos del jarabe, se colocaron en portaobjetos y se observaron en microscopio óptico compuesto y de contraste de fases de forma directa, antes y después de teñirlos. Para poder observarlos se tiñeron de forma individual agregando 5 gotas de los siguientes colorantes: azul de toluidina (300 ppm), azul de metileno (300 ppm), cristal violeta (2% en etanol), rojo congo 100 ppm), y yodo lugol (1N).

1.2 AISLAMIENTO POR CENTRIFUGACIÓN (FL1)

A partir de un contenedor con 1000 L de jarabe fabricado en 2011 los flóculos precipitados fueron separados del jarabe contenido en tanques tipo tolva o cono al drenar la parte inferior del tanque. El jarabe residual fue eliminado por centrifugación y un enjuague con agua. El anterior procedimiento fue realizado en la planta de IMAG. Recibimos una muestra de aproximadamente 50g. Una alícuota de 10 g de FL1 fue homogenizada con N₂ líquido y triturada con mortero y pistilo.

1.3 AISLAMIENTO POR FILTRACIÓN (FL2)

Quince galones de jarabe (aprox. 57 litros) fabricados a principios de 2013 fueron filtrados a través de fieltro y se obtuvo un jarabe concentrado de flóculos (~180 g). Diez gramos de este concentrado fueron secados eliminando el jarabe por absorción en membranas de celulosa de poro de 0.45 µm y papel filtro en forma de sándwich dentro de una caja de Petri, cambiando las láminas de papel filtro cada 24

h durante 4 días. Se recuperó el sólido entre las membranas y se secó en estufa a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, se homogenizó con nitrógeno líquido y se trituró con uso de mortero y pistilo. El flóculo FL2 homogenizado fue secado a temperatura constante ($60 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 48 h.

1.4 AISLAMIENTO CON ETANOL (FL3)

Un porrón de 20 L de jarabe con flóculos producido en 2011 fue homogenizado por agitación. Se tomó 1L de jarabe homogenizado y se le agregaron 5 L de etanol al 96%. Se agitó la mezcla durante 15 min y se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. Se decantó la fase acuosa y al precipitado se le agregó agua para disolverlo. Se calentó a 70°C por 10 min y se le agregó 1 L de etanol al 96%, posteriormente se agitó durante 15 min y se dejó en reposo durante la noche. Se separó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 500 ml de etanol absoluto anhidro para deshidratar y obtener un precipitado que fue secado en horno a 60°C durante 12h. Este precipitado pesó aproximadamente 2.7 g. El sobrenadante se dejó en reposo a -20°C durante 48 h y el precipitado obtenido fue de aproximadamente 0.83 g. El sobrenadante fue sometido a un segundo ciclo de reposo a -20°C durante 7 días y se obtuvieron 21 mg de precipitado.

2. ESTRUCTURA GENERAL E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES

2.1 DETERMINACIÓN GENERAL DE COMPOSICIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADAS DE FOURIER (FT-IR)

Las muestras de los flóculos fueron analizadas por espectrofotometría de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) con un espectrofotómetro de infrarrojos marca Thermo Scientific por el método de ATR. Los espectros fueron procesados con el software Spectrum FT-IR de Perkin Elmer y analizados con el software Know It All Informatics System 9.0, de BioRad.

2.2. CONTENIDO DE AGUA Y HUMEDAD

2.2.1. Contenido de agua en FL1

Se determinó el contenido de agua en FL1 por gravimetría. Se tomaron 200 mg de FL1 y por triplicado fueron colocados en charolas previamente pesadas. Las muestras se secaron a temperatura constante ($65 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 48 h. Se determinó el porcentaje de humedad para cada réplica de la siguiente forma: $H = \frac{P_f * 100}{P_i}$, donde P_f es el peso final de la muestra y P_i es el peso inicial.

2.2.2. Humedad en FL2 y FL3

Debido a que la preparación de FL2 y FL3 llevaron un proceso previo de secado, la determinación de humedad en las muestras se realizó a través de la medición de actividad de agua (a_w) para conocer el contenido de agua libre en dichas muestras. El valor de a_w se determinó con el dispositivo medidor de actividad de agua Pa_wkit (Decagon Devices, Inc.).

2.3 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Se realizó un análisis por cromatografía de capa fina (TLC) de los flóculos para conocer su perfil cromatográfico de carbohidratos y observar la presencia polisacáridos u oligosacáridos. Se utilizaron placas de sílica gel 60 F254 de 20 cm en soporte de aluminio (Merck), las cuales se desarrollaron con el siguiente sistema de solventes: butanol : ácido acético : IPA : agua (8:4:7:3), de acuerdo a la técnica propuesta por Xu y colaboradores (2008) durante 5 horas. Se sacaron de la cámara y se dejaron secar a temperatura ambiente en un sitio ventilado durante 2 horas. El reactivo de visualización se preparó mezclando 2 ml de anilina y 2 g de difenilamina en 82 ml de acetona y agregando lentamente 15 ml de ácido fosfórico concentrado; se sumergió la placa en esta solución durante 5 segundos, se dejó secar durante 10 minutos y se horneó a 120°C durante 20 min (Anderson, Li, and Li 2000). El perfil de bandas fue comparado con el de estándares de monosacáridos: fructosa, dextrosa, xilosa, galactosa, maltosa y el disacárido sacarosa.

2.4. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO (DNS)

Este método cuantifica la concentración de azúcares reductores en una muestra al reaccionar el oxígeno libre del carbono anomérico del azúcar con el ácido 3,5 dinitrosalicílico, generando una coloración desde amarilla hasta café (G. L. Miller 1959).

Reactivo de DNS: 1 g de DNS se disuelve en 50 ml de agua destilada, se agregan 30 g de tartrato de sodio y potasio lentamente y una vez disuelto se agregan 20 ml de NaOH 2N. La solución se afora a 100 ml con agua destilada.

Las muestras se calientan a ebullición en baño maría durante 30 min. Se enfrían a temperatura ambiente y se leen en espectrofotómetro UV-VIS a 542 nm.

Los datos obtenidos se analizaron en Excel por extrapolación en base a la ecuación de la recta generada por la curva de calibración con un índice de correlación de $r^2 \geq 0.996$.

Para la curva de calibración se prepara una solución estándar 100 mM de glucosa/fructosa y se agrega a la reacción como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de las muestras para análisis por DNS

Estándar (ml)	DNS (ml)	Agua (ml)	Vol. final (ml)
0.2	1	1.8	10
0.4	1	1.6	10
0.6	1	1.4	10
0.8	1	1.2	10
Muestra desconocida (0.05-200)	1	1.8-1.95	10

2.5. EXTRACCIÓN DE COMPONENTES POR RANGO DE POLARIDAD

Para determinar el tipo de componentes de los flóculos se realizó la extracción consecutiva de una muestra de 2 g de FL1 mediante el uso de solventes con diferente rango de polaridad. Las extracciones se realizaron con solventes en orden ascendente de polaridad. Para cada solvente utilizado, la muestra fue eluida tres veces con 15 ml del solvente. Cada extracción tuvo una duración de 24h. Al inicio de cada extracción, la muestra con el solvente se calentó a 50°C durante 10 min en baño maría. Se dejó en reposo a temperatura ambiente y transcurridas las 24 horas se retiró el sobrenadante para volver a agregar el solvente para la siguiente

extracción. Los sobrenadantes de cada solvente fueron secados por evaporación utilizando un evaporador rotatorio a 60°C. Los residuos de cada extracción fueron secados por completo con flujo de N₂ gaseoso y pesados hasta lograr una variación menor a 0.0009 g. Entre cada determinación de peso las muestras fueron colocadas en desecador al vacío para evitar humedecimiento. Los solventes se enlistan en el orden que fueron utilizados: tolueno, cloroformo, butanol, isopropanol (IPA) y agua destilada (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

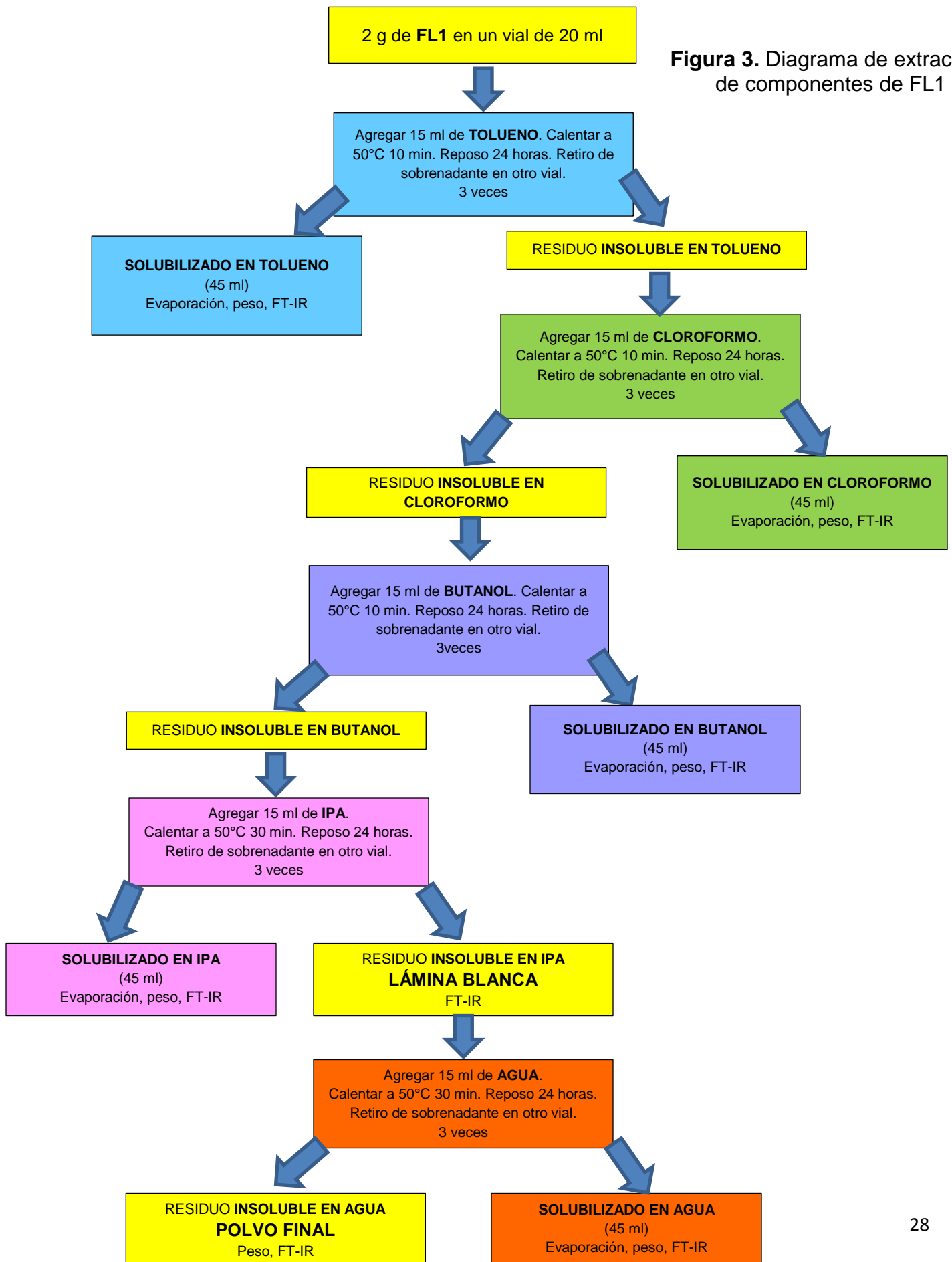


Figura 3. Diagrama de extracción de componentes de FL1

2.6. HIDRÓLISIS DE LOS FLÓCULOS

2.6.1. Hidrólisis ácida

Se realizó la hidrólisis ácida de los flóculos para determinar la presencia de polisacáridos bajo las siguientes condiciones: HCl 0.5 M, 24 horas, 40°C, FL1: 90 mg/ml, FL2: 30 mg/ml, FL3: 30 mg/ml. Los productos de hidrólisis fueron analizados por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico para la determinación de azúcares reductores (G. L. Miller 1959) y su perfil cromatográfico por TLC.

Hidrólisis del residuo de extracción insoluble en IPA (lámina blanca). Se realizó la hidrólisis ácida de las láminas blancas formadas por FL1 y FL2. Seis miligramos de lámina blanca de FL1 y 8 mg de lámina blanca de FL2 fueron suspendidos de forma individual en 1 ml de HCl 0.1 M e hidrolizados durante 120 minutos a 90°C. El sobrenadante fue aplicado en una placa de TLC y revelado con la técnica para la visualización de carbohidratos descrita en 2.3. También se cuantificó la cantidad de azúcares reductores por el método del DNS.

2.6.2. Hidrólisis enzimática

Para lograr un acercamiento a la composición de estos polisacáridos se realizó la hidrólisis de los flóculos con diferentes enzimas que se enlistan en la **Tabla**

2.

Tabla 2. Enzimas utilizadas para la hidrólisis de los flóculos

Enzima	Concentración (U/ml)
Pectinasa de <i>Rhizopus sp.</i> (Sigma-Aldrich)	0.405
Laminarinasa de <i>Trichoderma sp.</i> (Sigma-Aldrich)	0.1
Celulasa de <i>Trichoderma viridae</i> (Sigma-Aldrich)	7.5
Hemicelulasa de <i>Aspergillus niger</i> (Sigma-Aldrich)	1
Inulinasa de <i>Aspergillus niger</i> (Fructozyme L)	1
*Levanasa (Instituto de Biotecnología UNAM)	3.7

*Las condiciones de hidrólisis con levanasa consistieron en buffer de fosfatos 10 mM, pH 6.0, temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 24 h.

Condiciones de hidrólisis: temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 5.5, en buffer de acetato de sodio 100 mM, 24 h.

La hidrólisis se analizó por cromatografía de capa fina (TLC) y se cuantificaron azúcares reductores por el método del DNS.

2.7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GALACTURÓNICO (PECTINA)

Para determinar la presencia y cantidad de ácido galacturónico, FL1 y FL2 fueron hidrolizados con pectinasa mediante el siguiente procedimiento: en buffer de acetato de sodio 50mM, pH 4.5 se suspendió la pectinasa (0.1%, equivalente a 0.405 U/ml, Sigma-Aldrich). Se hizo una suspensión de FL1 de 1 mg/ml y FL2 de 40 mg/ml y una suspensión de pectina de cítricos (sigma) a una concentración de 0.1 mg/ml. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo a 40°C durante 24 horas. Al término de la

reacción se ajustó el pH a 7.8 para la hidrólisis consecutiva con pectinesterasa (1.50U U/ml, Sigma-Aldrich) a 40°C durante 1h. La muestra hidrolizada fue analizada para la determinación de ácido galacturónico de acuerdo con las instrucciones del kit K-Uronic de Megazyme.

2.8 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS POR FT-IR

Cada extracto fue analizado por FT-IR para determinar de manera general el tipo de compuesto presente. La interpretación de los espectros se realizó con ayuda del programa Analyze It-IR (KnowItAll Informatic Systems, BioRad).

2.9 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA DISPERSANTE DE RAYOS X (SEM/EDS)

Se analizó la estructura y composición de las láminas blancas de FL1 y FL2 así como el residuo final de las extracciones de FL1 mediante microscopía electrónica de barrido con un microscopio electrónico modelo JSM-6010LA marca JEOL. Sin tratamiento previo se colocaron las muestras sobre una superficie adhesiva de grafito y se analizaron aplicando bajo vacío sobre la muestra. Se analizó la estructura a diferentes ampliaciones para obtener una mayor información. La composición elemental de las muestras fue analizada por EDS (Espectroscopía dispersante de rayos X), el cual calcula la concentración de su composición elemental. Datos de composición y concentración en porcentaje fueron obtenidos con este análisis.

2.10 CONTENIDO DE CENIZAS EN FL1 y FL2

Se realizó la calcinación dos muestras de FL1 y FL2 a 645 °C hasta observar la presencia de cenizas blancas (3-4 días) y se determinó el contenido por gravimetría a peso constante.

2.11 DETERMINACIÓN DE SÍLICE EN LOS FLÓCULOS POR COLORIMETRÍA CON MOLIBDATO DE AMONIO

La determinación de sílice se realizó de acuerdo con el método colorimétrico de la Norma Mexicana AA-075-1982 (NMX-AA-075-1982 1992). Las muestras fueron tratadas de acuerdo al procedimiento descrito en la Norma y se cuantificó la cantidad de sílice con un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1800 a una longitud de onda de 410 nm.

2.12 DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La determinación de calcio se realizó de acuerdo con la Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001 Análisis de agua. Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas (NMX-AA-051-SCFI-2001 2001), que estipula el método de espectrofotometría de absorción atómica para cuantificar la concentración de calcio en la muestra. Las muestras fueron analizadas con un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo A-Analyst 300 de llama aire-acetileno a una longitud de onda de 422.7 nm.

2.13 CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE LOS FLÓCULOS EN EL JARABE POR PRECIPITACIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA

Se prepararon diferentes tratamientos para jarabes con flóculos y sin flóculos de acuerdo a la **Tabla 3**:

Tabla 3. Preparación de muestras para cuantificación de flóculos.

Conc. Jarabe (µl/mL)	0	5	10	20	40	80
Azul de toluidina 10 ppm	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Jarabe	0 µl	50 µl	100 µl	200 µl	400 µl	800 µl
Tween 80 4000 ppm	5 ml	5 ml	4.9 ml	4.8 ml	4.6 ml	4.2 ml

Las muestras se homogeneizaron mediante agitación en vórtex y sonicación durante 10 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min para precipitar los flóculos y el sobrenadante fue analizado por espectrofotometría UV-Vis en un espectrofotómetro modelo Lambda 2 (Perkin Elmer) por densidad óptica a 634 y 550 nm. El cálculo del peso aproximado del flóculo unido al azul de toluidina fue de la siguiente forma: $Fl = \frac{16.39}{FAzT_{max}}$

Donde Fl es la concentración aproximada de flóculos en la muestra, 16.39 son los nmol de azul de toluidina presentes en 1 ml de una solución de 5ppm y FAz_{max} es la concentración de jarabe a la cual se forma el complejo máximo flóculo-azul de toluidina (OD_{634} más baja).

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO: OBSERVACIÓN Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS FLÓCULOS DEL JARABE

Como se muestra en la **Figura 4**, encontramos que los flóculos se tiñen con solución de yodo (I_3^-) 1N, con solución de azul de toluidina y con azul de metileno. En la **Figura 4a** podemos observar la formación de hilos o fibras; con azul de metileno se observa una estructura de aspecto esponjoso en la que se distinguen vagamente partículas esféricas formando el flóculo **Figura 4b**; dichas esferas se ven más claras en la **Figura 4c** en la que el flóculo está teñido con azul de metileno.

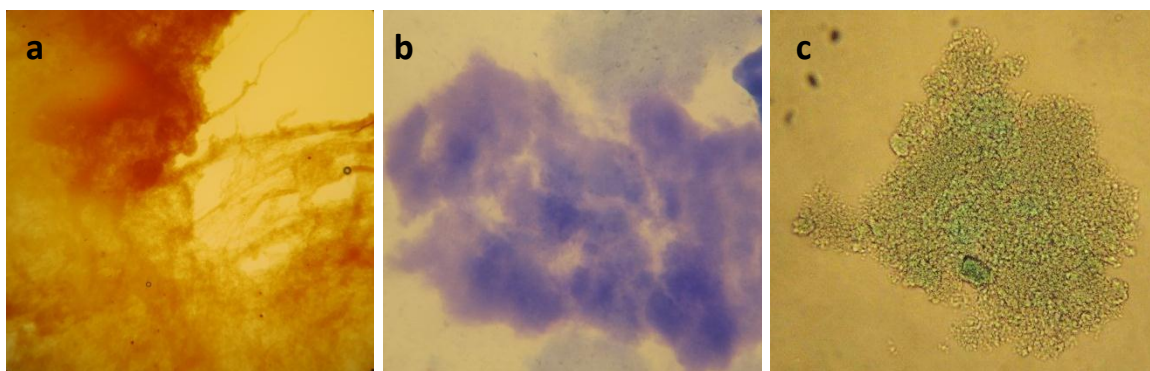


Figura 4. Flóculos de jarabe teñidos (a): con solución de yodo 1N (100X); (b): con azul de toluidina (100X); (c): con azul de metileno (400X).

La observación de los flóculos teñidos con yodo a través del microscopio de contraste de fases nos permitió distinguir la presencia de pequeñas esferas teñidas unidas formando hilos (**Figura 5a**). En la **Figura 5b** se muestran los “hilos” o fibras de forma ampliada en la que se puede observar de forma clara que las esferas son las que quedan teñidas por el yodo y no las fibras, siendo las esferas el punto de unión entre los hilos.

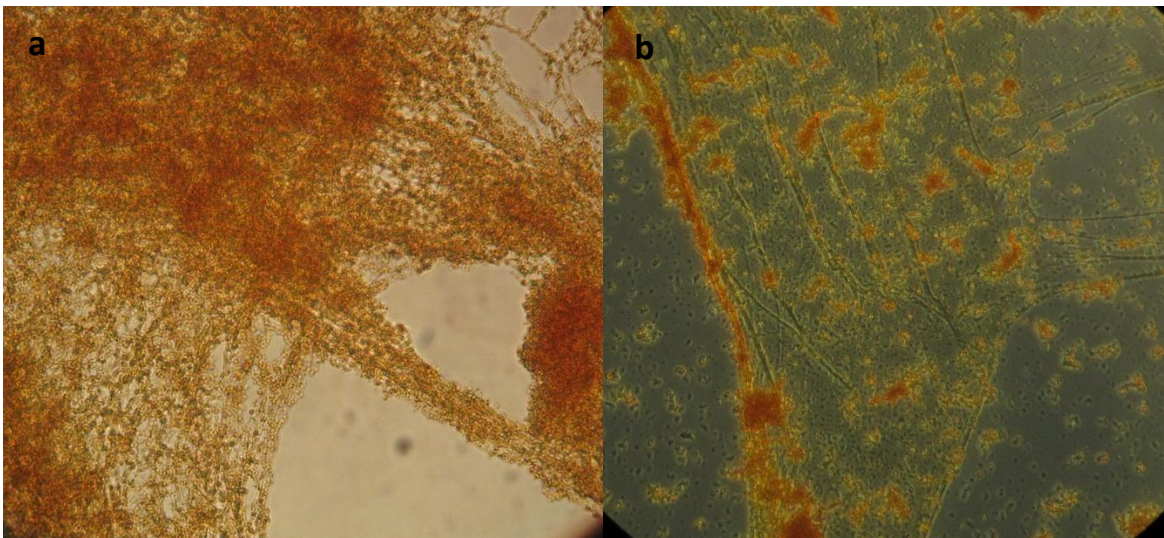


Figura 5. Flóculo teñido con yodo 1N y observado en microscopio óptico de contraste de fases.

2. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

2.1 Por centrifugación (FL1)

El procedimiento fue realizado en la planta de IMAG. El producto final fue un material de consistencia pastosa, color blanco grisáceo, cuyo peso aproximado fue de 50 g (Figura 6).



Figura 6. FL1 homogenizado.

Una alícuota de 10 g de FL1 fueron homogenizados con N₂ líquido y triturados con mortero y pistilo. El peso final fue de 9.49 g (Figura 6). Al tratar de disolver FL1 en agua se obtiene una suspensión turbia con partículas suspendidas que tienden a precipitar. El 89.8% ± 0.4 es soluble en agua, el 10.2% restante precipita.

2.2 Por filtración (FL2)

A partir de 10 g de jarabe concentrado de flóculos se obtuvo un producto final seco de 0.85 g, es decir, el 8.5% de la muestra inicial. (Figura 7). Al tratar de disolver FL2 en agua se obtiene una suspensión turbia con partículas que tienden a precipitar. De este flóculo, el $84.4\% \pm 1.4$ es soluble en agua y el 15.6% restante precipita como partículas.

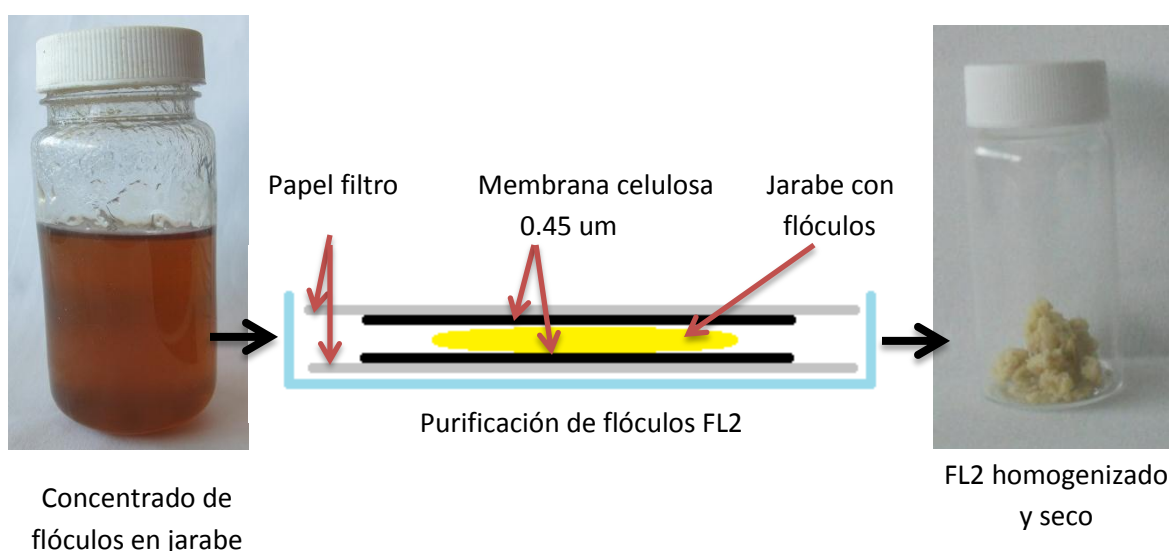


Figura 7. Proceso de obtención de FL2 a partir de jarabe con flóculos.

2.3 Por precipitación con etanol (FL3)

El primer precipitado obtenido pesó aproximadamente 2.7 g. El sobrenadante se dejó en reposo a -20°C durante 48 h y el precipitado obtenido fue de aproximadamente 0.83 g (Figura 8). Finalmente ese mismo sobrenadante volvió a dejarse en reposo a -20°C durante 7 días y se obtuvieron 21 mg. Al disolver FL3 en agua se obtiene una solución cristalina sin observación de partículas suspendidas o precipitadas. En total se obtuvieron 3.7 g de FL3 en polvo, lo que representa cerca

del 0.4% de flóculos en el jarabe. Este rendimiento no es constante, pues depende de la cantidad de flóculos presentes en la muestra de jarabe a tratar.

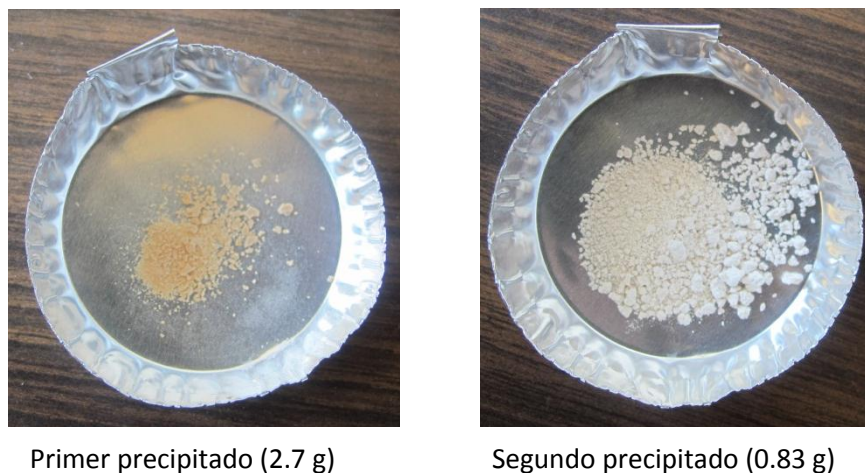


Figura 8. Flóculos secos obtenidos de jarabe por precipitación con etanol.

3. HUMEDAD Y CONTENIDO DE AGUA

3.1 Contenido de agua en FL1

Se determinó el contenido de agua en FL1 por gravimetría y se obtuvo que FL1 contiene 67.57 ± 0.304 % de agua.

3.2 Humedad en FL2 y FL3

Debido a que la preparación de FL2 y FL3 llevaron un proceso previo de secado, la determinación de humedad en las muestras se realizó a través de la medición de actividad de agua (a_w) para conocer el contenido de agua libre en dichas muestras. Para FL2 la actividad de agua fue de $a_w = 0.40 \pm 0.02$ y para FL3, $a_w = 0.19 \pm 0.02$.

4. DETERMINACIÓN DE PECTINA

Los resultados mostraron una concentración de ácido galacturónico para FL1 de 2.22 µg, que representa el 0.4% y para FL2 de 2.21 µg, que representan el 0.7% de pectina. No se realizó el análisis en FL3 porque se terminó la muestra.

5. EXTRACCIÓN DE COMPONENTES POR RANGO DE POLARIDAD

Las extracciones con solventes (Tabla 4) se realizaron con una muestra de FL1 para poder separar los componentes de los flóculos.

Tabla 4. Extractos de FL1 realizados con diferentes solventes en rango de polaridad ascendente.

Solvente	Peso del extracto ± (DE)	Porcentaje respecto a la muestra inicial
Tolueno	0.0014 ± 0.0002	0.07
Cloroformo	0.0019 ± 0.0002	0.09
Butanol	0.4391 ± 0.0007	21.90
IPA	0.0495 ± 0.0007	2.47
Agua	0.0981 ± 0.0004	4.89
Residuo	0.0679 ± 0.0004	3.38

Los extractos de tolueno y cloroformo nos indican que los flóculos contienen una pequeña fracción de compuestos lipofílicos. El mayor porcentaje de compuestos se solubilizó en butanol (21%), por lo que la mayor parte de los componentes son parcialmente hidrosolubles. Cerca del 5% de los componentes resultó soluble en agua y aproximadamente el 3% no se solubilizó en ninguno de los solventes probados, lo que sugiere la presencia de compuestos que requieran cierta acidez o

alcalinidad para disolverse. Solamente fue posible solubilizar el residuo en una solución alcalina de NaOH 1N. La humedad de FL1 fue determinada restando los sólidos totales (0.6578 g) al peso inicial de la muestra (2.0048 g), que resultó en 1.3470 g de agua en la muestra, equivalente a 67.19%. Este porcentaje de humedad es consistente con el obtenido en la prueba de determinación de humedad. Después del agua, el mayor componente corresponde al extracto de butanol con el 21.9%.

6. CONTENIDO DE CENIZAS

La insolubilidad del residuo final de las extracciones de FL1, marcó la pauta para la búsqueda de minerales en la muestra. La **Tabla 5** muestra los pesos y porcentaje correspondiente a cenizas de cada flóculo. FL1 contiene 2.76% de cenizas, mientras que FL2 contiene 3.56% y FL3, 1.5%.

Tabla 5. Contenido de cenizas en las muestras de FL1 y FL2

Muestra	Peso muestra fresca (g)	Peso de cenizas (g)	% respecto a peso de muestra
FL1	1.0365 (± 0.0016)	0.0286 (± 0.0003)	2.76%
FL2	0.5059 (± 0.0001)	0.0180 (± 0.0003)	3.56%
FL3	0.1846 (± 0.0005)	0.0028 (± 0.0006)	1.5%

7. CARACTERIZACIÓN DE FLÓCULOS PURIFICADOS Y SUS EXTRACTOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS (FT-IR)

7.1 Flóculos purificados

La Figura 9 muestra los principales grupos funcionales presentes en FL1 seco. En 3313.59 cm^{-1} se presenta el estiramiento de los grupos OH, y en 2930.50 cm^{-1} los grupos C-H de una cadena alifática que en este caso puede estar indicando la presencia de carbohidratos. La bandas en 1729.12 y en 1644.03 cm^{-1} son características del grupo carbonilo C=O y C=C respectivamente. El pico en 1037.75 cm^{-1} es indicativo del estiramiento C-O.

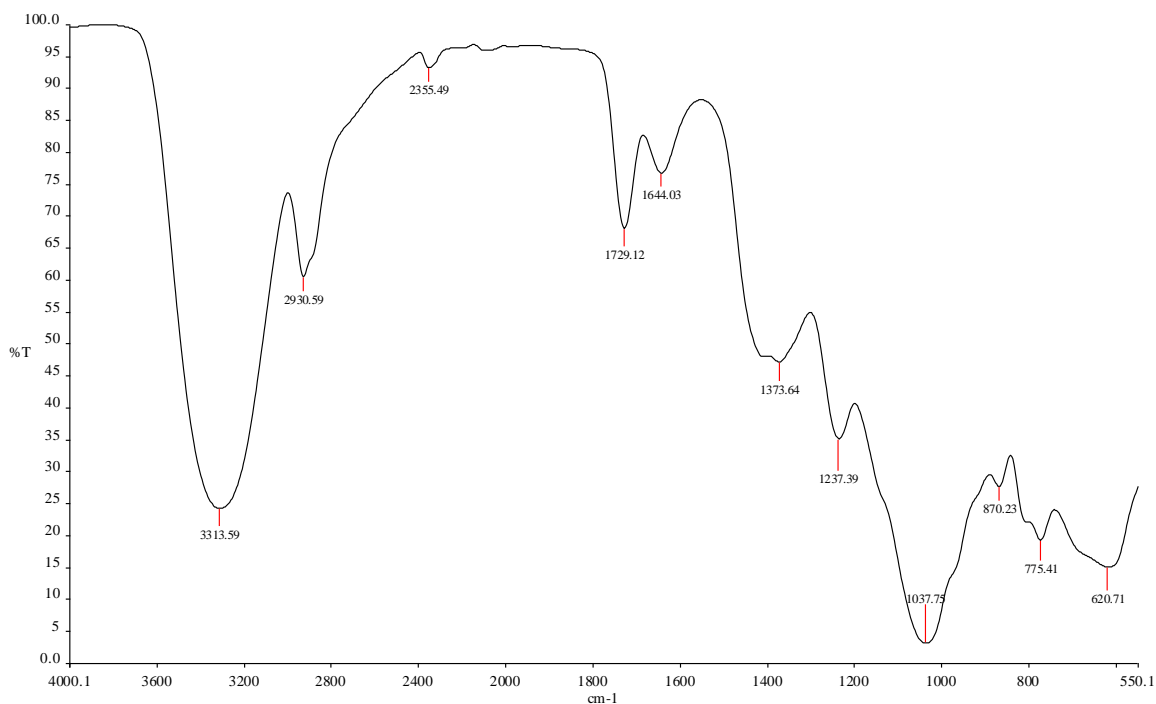


Figura 9. Espectro de FL1

En la Figura 10 se observa una banda correspondiente al enlace O-H (3385.74 cm^{-1}). El enlace C-H de estiramiento se observa en 2901.58 cm^{-1} , una señal débil en 1726.99 corresponde al grupo carbonilo (C=O), la pequeña banda en 1644.48 cm^{-1} corresponde al estiramiento C=C. 1335.34 cm^{-1} muestra la vibración $-\text{CH}_3$ y en 1045.43 se presenta la vibración de estiramiento C-O.

Al comparar los espectros de FL1 y FL2 (Figura 11) es posible observar la gran similitud entre ambos, con la presencia de bandas en 1400 y 1335 cm^{-1} en FL2, que no se presentan en FL1, y la presencia de un pequeño pico en 3513.17 cm^{-1} en FL2 el cual no está presente en FL1.

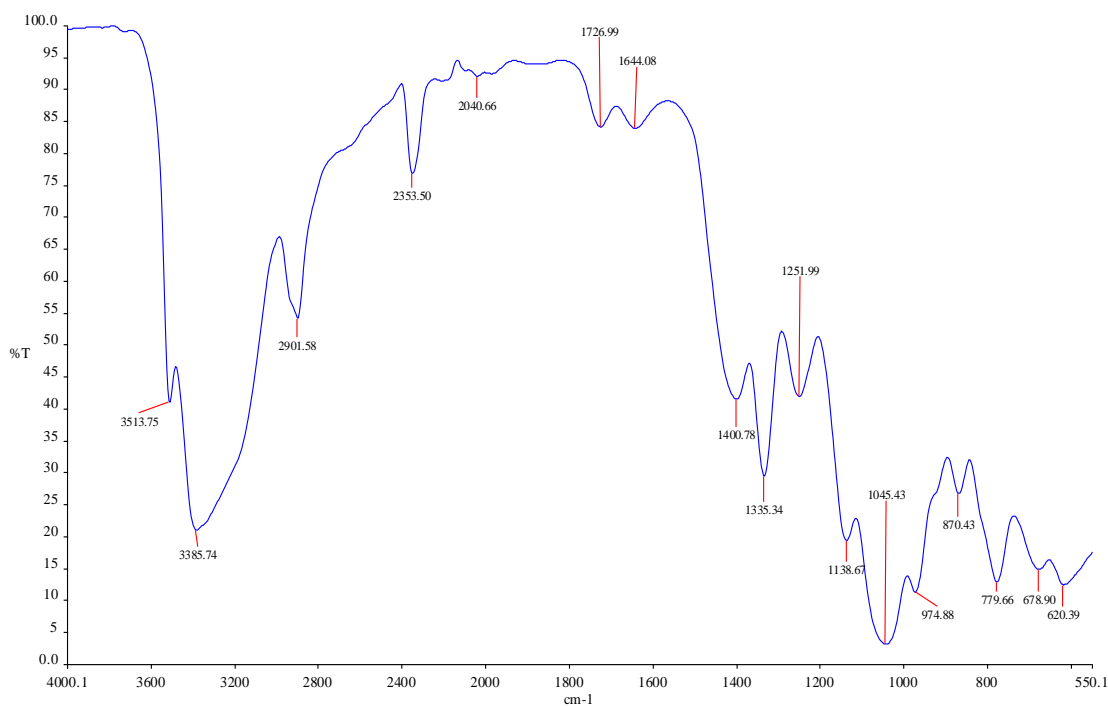


Figura 10. Espectro de infrarrojo de FL2.

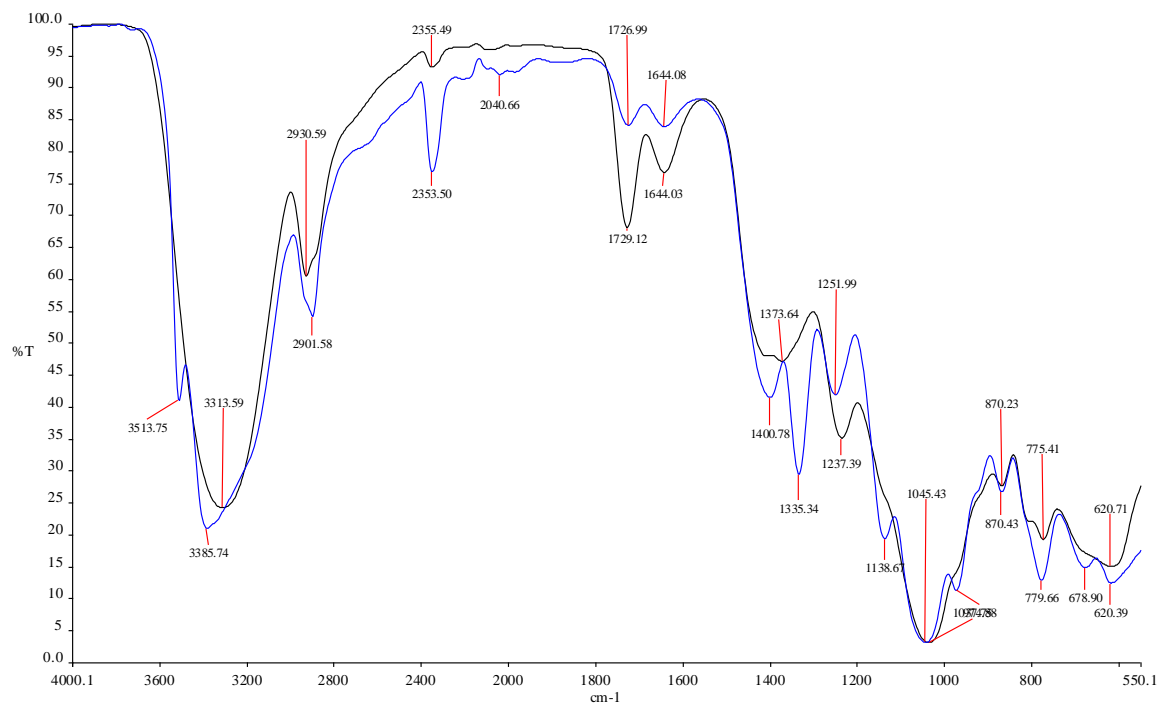


Figura 11. Espectro de infrarrojo de FL2 (azul) y FL1 (negro)

Las bandas en FL3 (Figura 12) se presentan de forma más grande y ancha, lo que indica la presencia de una mezcla de compuestos. El pico en 3285.08 cm^{-1} muestra la presencia de estiramiento de O-H y de C-H en 2927.7 cm^{-1} . La banda en 1608.52 cm^{-1} indica la presencia de grupos C=O. La banda en 1416.18 cm^{-1} indica el doblamiento C-H y en 1020 cm^{-1} se presenta el estiramiento C-O, lo cual podría indicar que se trata de una mezcla de carbohidratos.

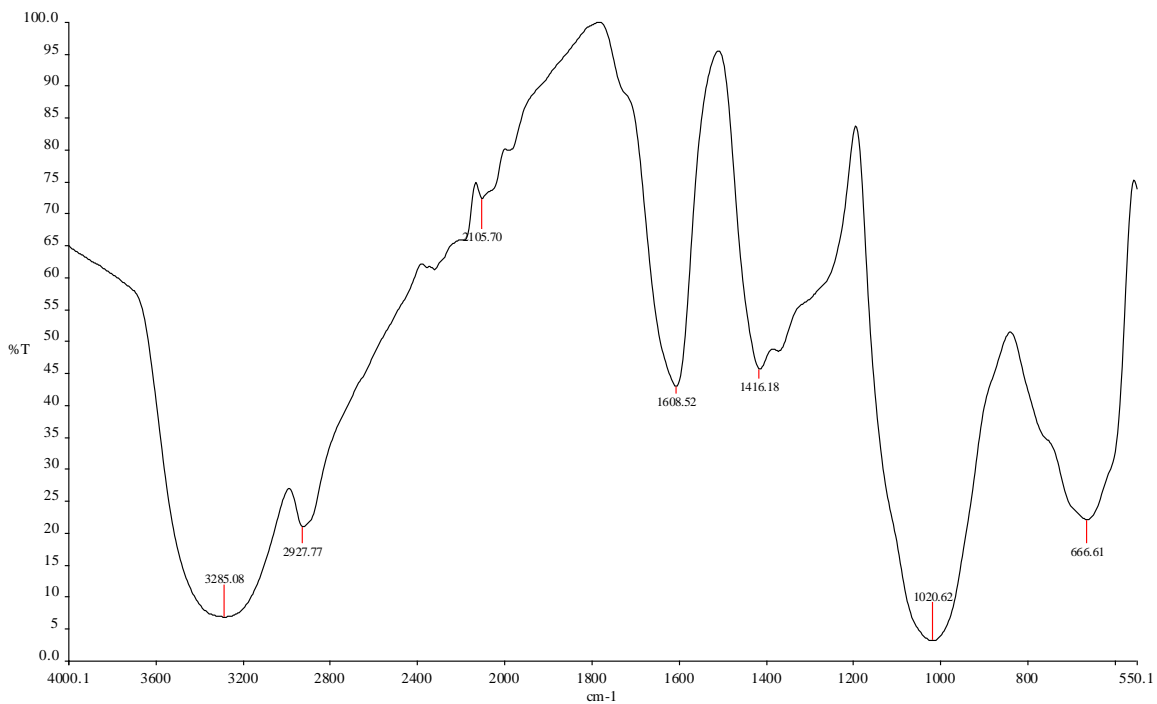


Figura 12. Espectro de infrarrojo de FL3.

7.2 Extractos de flóculos FL1

Extracto soluble en cloroformo. En la **Figura 13**, las fuertes bandas que se presentan en 2924.22 y 2958.22 cm^{-1} , son indicativas de la presencia de enlaces sencillos C-H, así como la de 1739.18 cm^{-1} es indicativa de enlaces éster C=O. El pico representativo del estiramiento C-O se presenta en 1159.23 cm^{-1} . Por los picos que presenta y su solubilidad puede tratarse de un ácido graso.

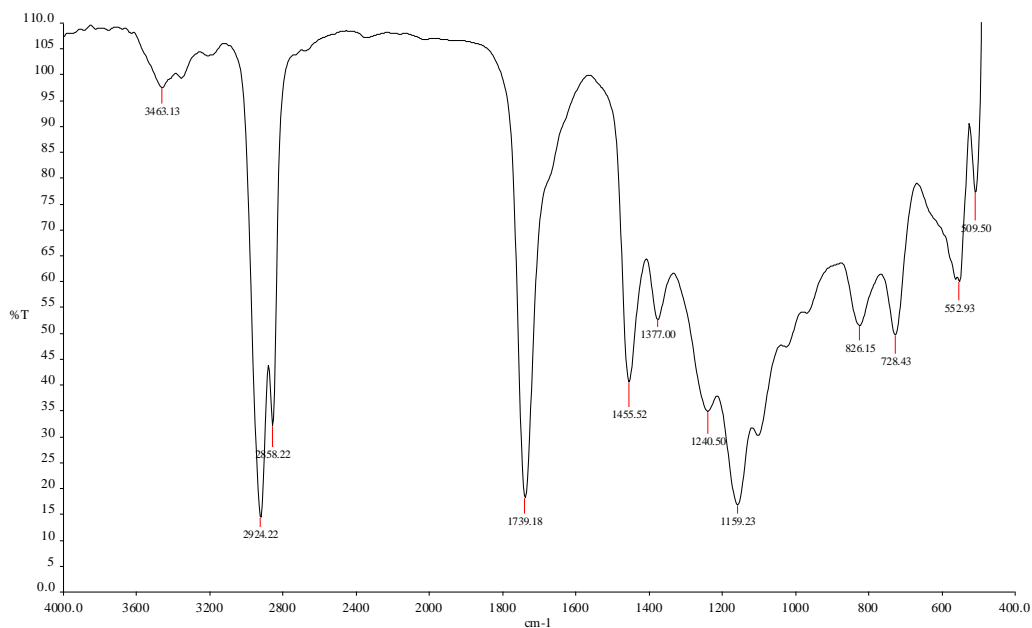


Figura 13. Extracto de FL1 soluble en cloroformo.

Extracto soluble en Butanol e IPA. El extracto soluble en butanol fue el que mayor porcentaje representó en la composición de FL1 (21.9%).

Al compararlo con el espectro del extracto soluble en IPA, podemos suponer que se trata del mismo tipo de compuestos (Figura 14). El pico en 3394 es indicativo de grupos OH, el pico en 2935 indica la presencia de enlaces C-H y la banda en 1640.15 cm^{-1} corresponde al estiramiento C=C. La región alrededor de 1050 cm^{-1} corresponde a enlaces C-O. Esto nos sugiere la presencia de azúcares en la muestra. Por esta razón, estos extractos se compararon con una muestra de fructosa (Sigma-Aldrich) (Figura 15).

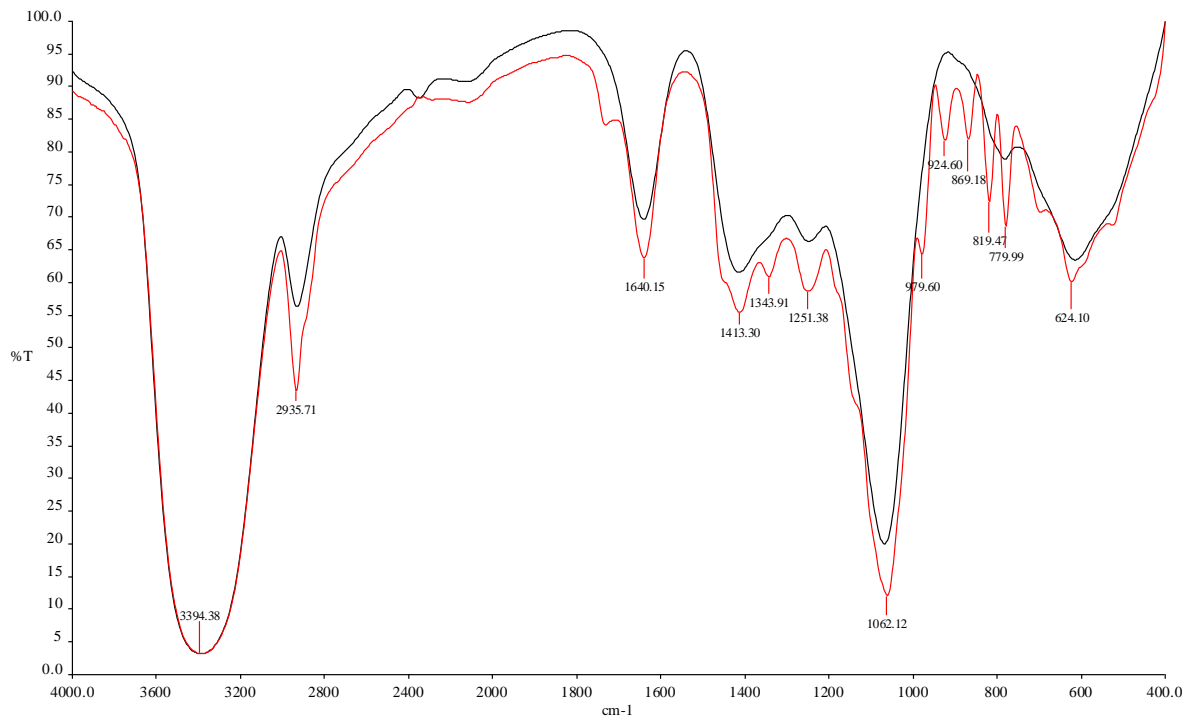


Figura 14. Extractos de butanol (rojo) e IPA (Negro)

La comparación del extracto de butanol con el espectro de fructosa nos indica que el extracto de butanol contiene compuestos que muy probablemente se traten de azúcares, así como también el extracto de IPA. Consideramos que estos extractos corresponden a la fructosa residual del jarabe que contiene FL1, que suma cerca del 25% de la composición total de FL1.

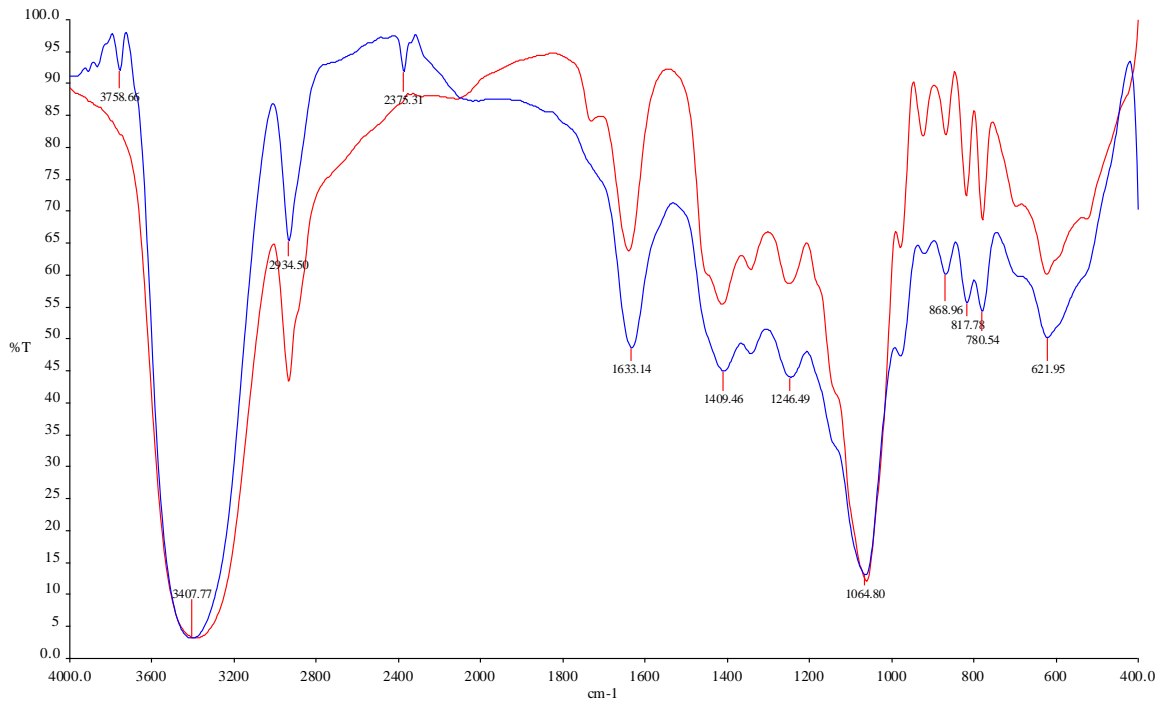
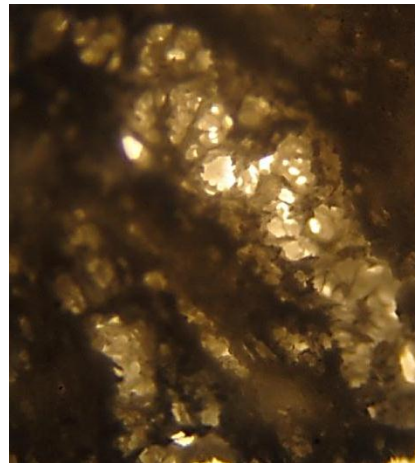


Figura 15. Extracto de butanol (rojo) y fructosa grado reactivo (azul)

Residuo insoluble en IPA: lámina blanca. Después de la extracción con IPA, el residuo insoluble formó una delgada lámina blanca como se muestra en la **Figura 16**.



a **Figura 16.** a. Lámina blanca. b. Fotografía en microscopio óptico compuesto aumento 100X

El espectro de la lámina blanca muestra fuertes bandas en 3380.96, 1730.63, 1643.98, 1373.91 y 1065.61 cm^{-1} , indicativas de las vibraciones de estiramiento O-H, C=O, C=C, y C-O respectivamente (Figura 17), por lo que muy probablemente se trate de algún oligosacárido debido a que no se disolvió en butanol ni en IPA.

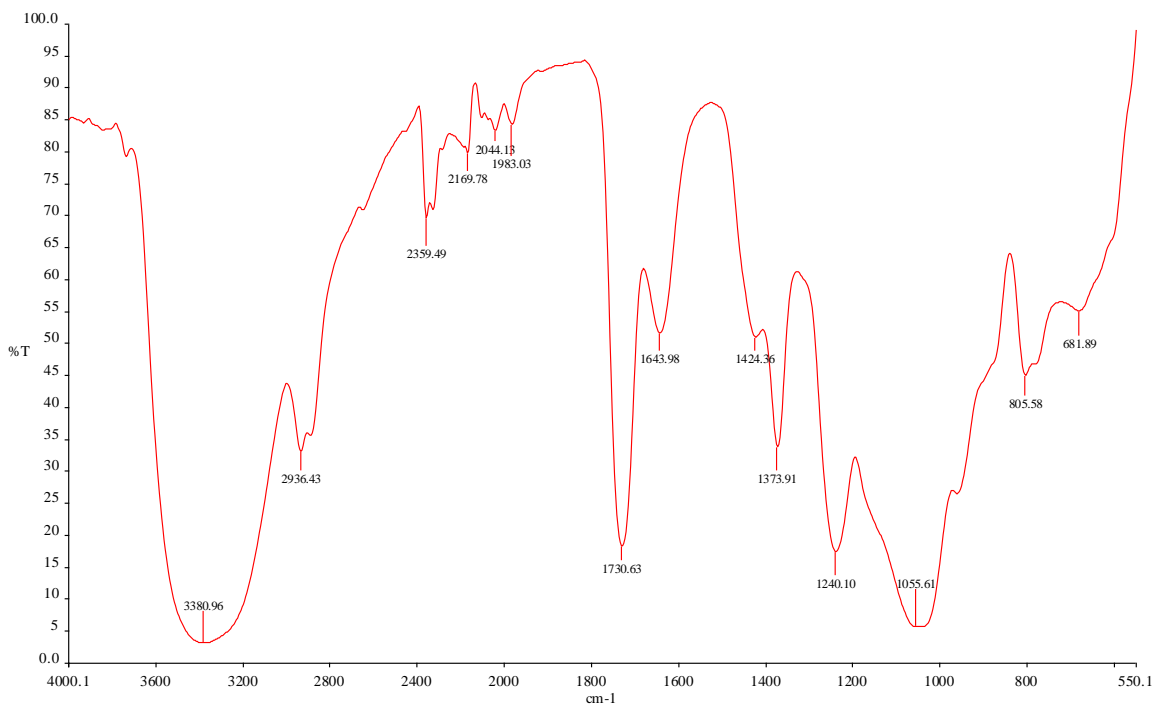


Figura 17. Espectro de lámina blanca de FL1.

Extracto soluble en agua. El espectro del extracto soluble en agua (Figura 18) es prácticamente idéntico al espectro de la lámina blanca (Figura 17). Muestra la presencia del estiramiento de O-H en 3384.12 cm^{-1} ; en 2932.87 cm^{-1} se observa el estiramiento C-H; una fuerte banda en 1730.83 cm^{-1} y otra en 1643.35 cm^{-1} indicativas de la vibración de estiramiento de C=C; otra banda en 1373.49 cm^{-1} que corresponde al movimiento de vaivén de C-H; en 1042.15 cm^{-1} se presenta el estiramiento C-O. Es importante comentar que durante el proceso de extracción con agua, la lámina blanca se desintegró quedando un residuo gris insoluble.

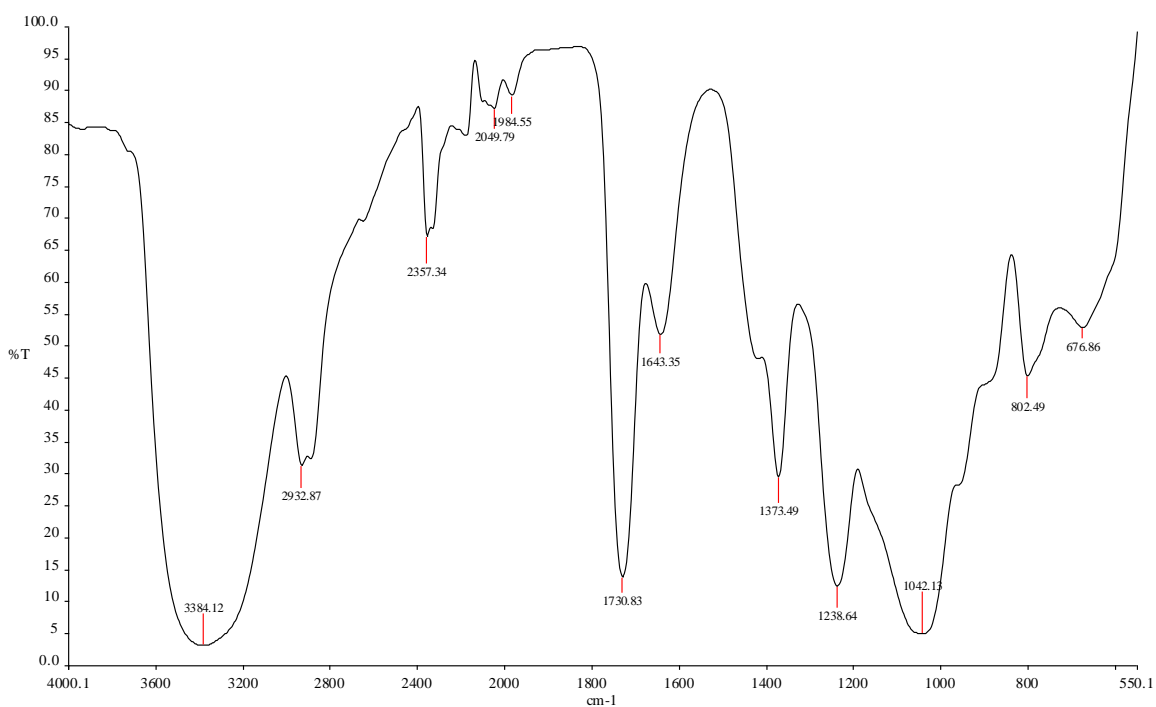


Figura 18. Espectro del extracto soluble en agua de FL1.

Composición de la fracción insoluble. El análisis de FT-IR del residuo de las extracciones con los diferentes solventes de FL1 (Figura 19) presenta una gran banda en 3382.64 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento de O-H, un pico intenso en 1729.5 cm^{-1} , de la vibración de estiramiento C=O y otro pico muy ancho en 1042.13 cm^{-1} , indicativo del estiramiento C-O, pero también podría indicar la presencia de otro compuesto debido a su gran tamaño.

Es posible que se trate de un ácido carboxílico pues presenta una banda de estiramiento O-H en 3382 cm^{-1} , otra banda indicativa del grupo carbonilo en 1729 cm^{-1} , el doblamiento de O-H en 1376 cm^{-1} y cerca de 900 cm^{-1} (hombro). La banda en 1640 cm^{-1} indica la presencia de C=O disociado de los ácidos carboxílicos y el pico

en 1040.29 cm^{-1} podría deberse al estiramiento C-O pero también a la presencia de algún otro compuesto, pues es muy ancha.

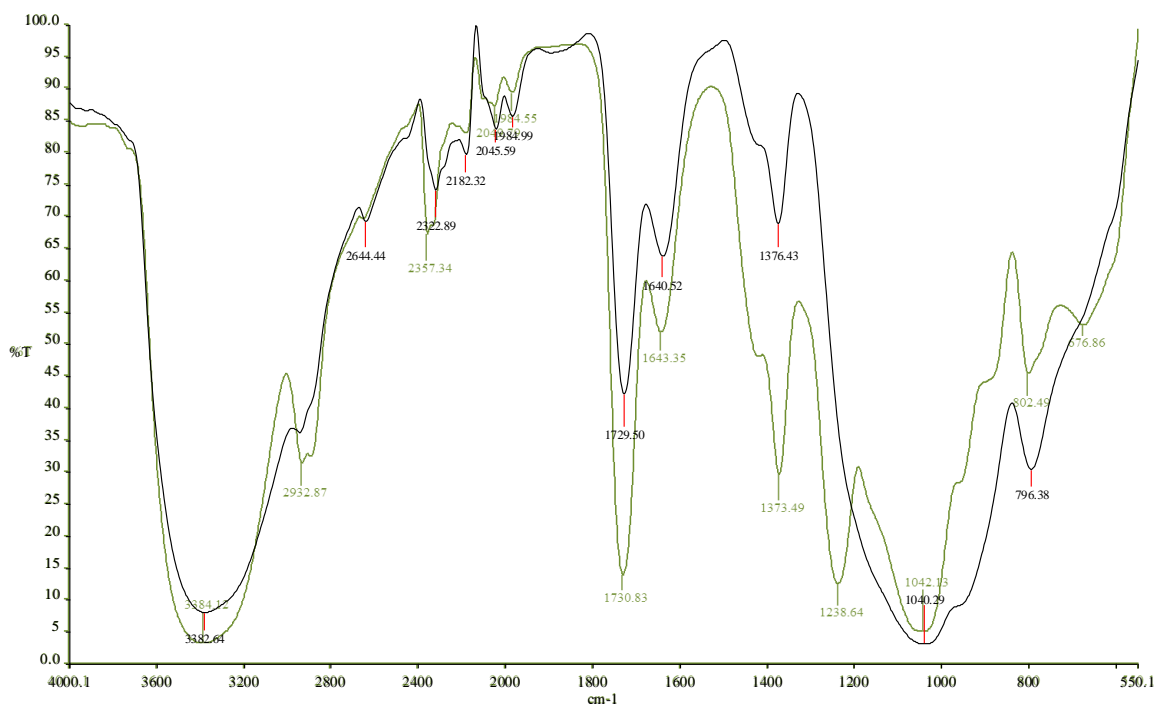


Figura 19. Extracto acuoso de FL1 (verde) y residuo de extracciones insoluble en agua (negro).

7.3 Cenizas de los flóculos

La **Figura 20** muestra los espectros de FT-IR de las cenizas de FL1 y FL2 comparadas con estándar de sílice. La banda de FL1 en 3383.16 cm^{-1} es indicativa de la vibración de estiramiento O-H de moléculas de agua. El pico en 1636.40 cm^{-1} corresponde al doblamiento de las moléculas de agua. El hombro cercano a 3200 cm^{-1} podría tratarse del estiramiento silanol (Si-OH). El pico fuerte y ancho en 1066.38 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento asimétricas de Si-O-Si. Por último, la banda en 796.16 cm^{-1} indica vibraciones de estiramiento simétricas de Si-O-Si (Miller y Wilkins, 1952; Musić, et al., 2011). Por lo anterior, se puede decir que las cenizas de los flóculos corresponden a silicatos.

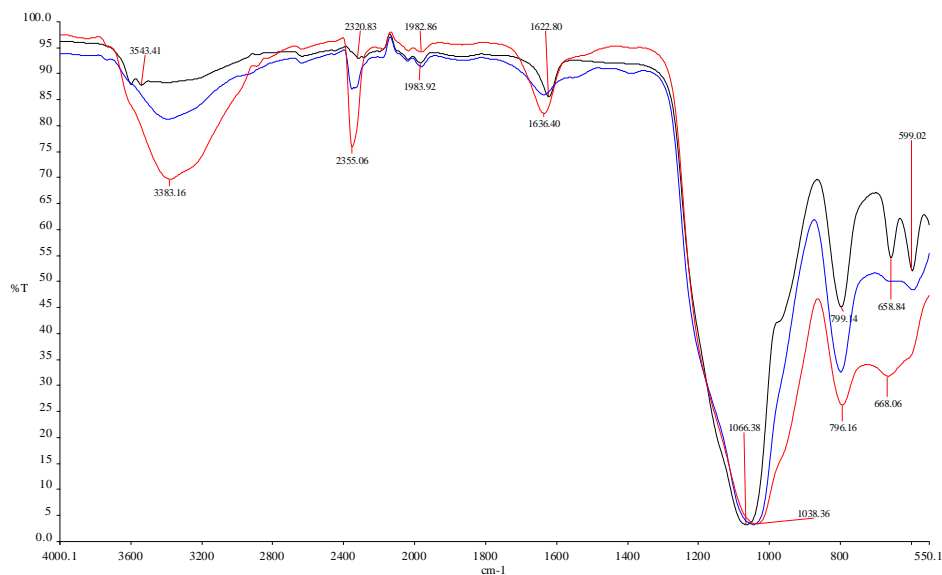


Figura 20. Negro: Sílica gel tipo 60 (Merck); Rojo: FL1; azul: FL2

Para detectar la presencia de calcio se amplió el espectro de análisis hasta 250 cm^{-1} . La **Figura 21** muestra la presencia de una banda indicativa de calcio (375.36 cm^{-1}) en la muestra de FL1 de acuerdo con lo reportado por Yu y colaboradores (2004), y que no aparece en FL2 ni en el estándar de sílica. Solo FL1 muestra la presencia de calcio en 375 cm^{-1} , lo que coincide con la de calcio determinada para FL1 de 61,310 ppm (Tabla 7).

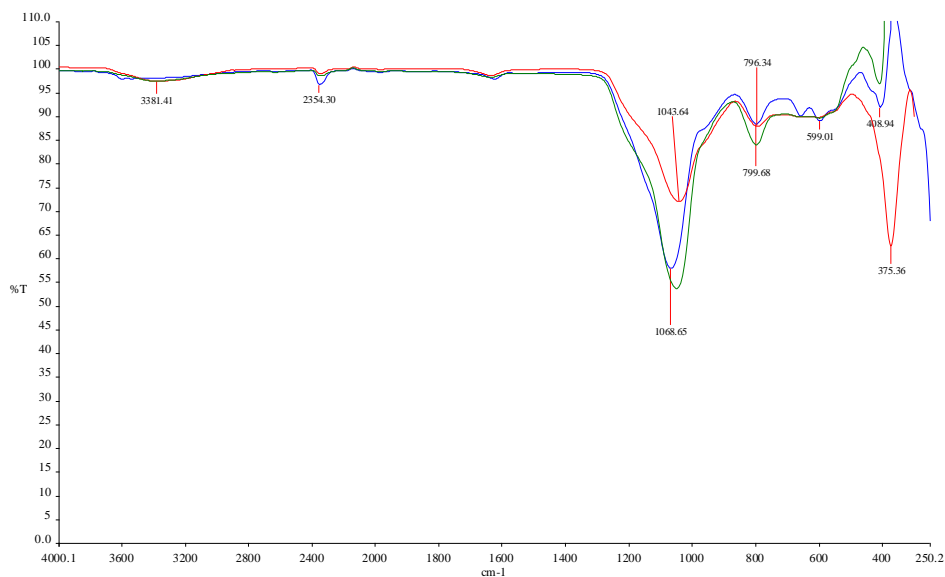


Figura 21. Azul: sílica gel (Merck); rojo: FL1; verde: FL2.

8. DETERMINACIÓN DE SÍLICE

De acuerdo con los resultados mostrados en el espectro de infrarrojos, se prosiguió a la cuantificación de sílice por colorimetría según la Norma Mexicana NMX-AA-75-1982 en los flóculos, el jugo y en el agua utilizada para la extracción del jugo en el difusor.

8.1 En los flóculos

En la Tabla 6 se presenta el contenido de sílice en las cenizas (FL1 y FL2) y en la muestra directa (FL3).

Tabla 6. Concentración de sílice en los flóculos.

Muestra	Sílice en muestra directa (ppm)	Sílice en cenizas (ppm)
FL1	-	68.11
FL2	-	173.09
FL3	115.75	-

8.2 En jugo de agave

Para determinar el origen de la sílice en los flóculos se analizaron muestras de jugo puro resultando en una concentración de sílice no detectable (< 2.52 ppm). El jugo tratado con dióxido de silicio dio una concentración de 3.27 ppm, justo arriba del límite de detección del método. Estos resultados indican que el origen de la sílice es de una fuente externa al jugo, posiblemente del agua de pozo que se utiliza para el proceso de producción.

8.3 En agua de proceso

Se analizó el contenido de sílice en el agua que se utiliza para la producción del jarabe: extraída de pozo y condensada del proceso de evaporación del jugo. No se detectó la presencia de sílice en la muestra de agua de condensación (< 2.52 ppm). En el caso del agua de pozo se realizaron determinaciones en muestras tomadas cada mes durante 4 meses para monitorear el contenido de sílice. La concentración de sílice en las muestras va de 40.77 a 52.22 ppm en los meses monitoreados (Figura 22).

Aunque el agua de condensación no presenta sílice, no se ha correlacionado la presencia o ausencia de flóculos en jarabes producidos con agua de condensación obtenida al evaporar el agua del jugo hidrolizado para la producción del jarabe. Se realizaron pruebas para determinar si el suavizador de agua era capaz de remover el sílice del agua de proceso. Los resultados demostraron que el suavizador no tiene efecto en el sílice. La concentración de sílice a la entrada del suavizador fue de 45.54 ppm mientras que a la salida fue de 45.68 ppm.

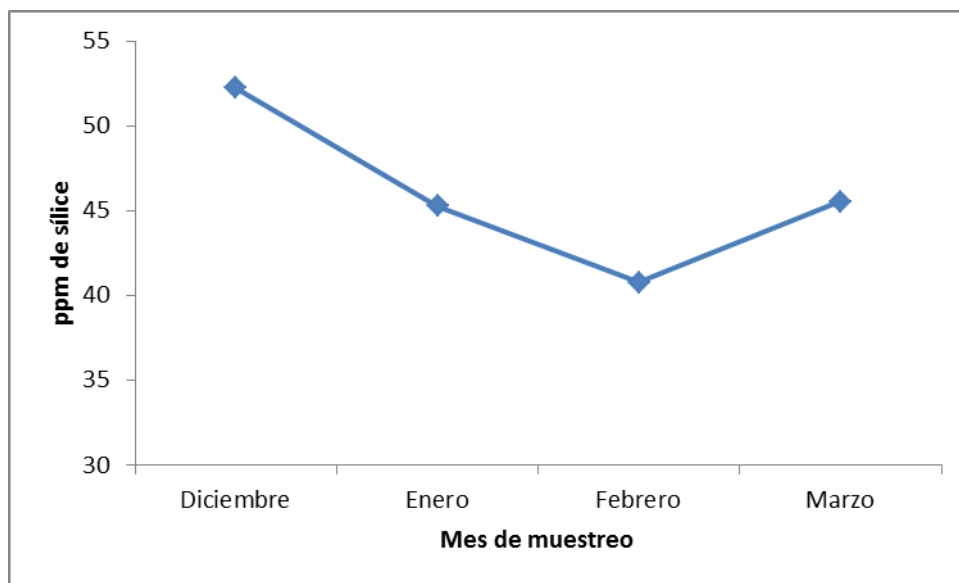


Figura 22. Concentración de sílice en las muestras de agua de proceso.

9. DETERMINACIÓN DE CALCIO

En la **Tabla 7** se muestran los datos obtenidos de la concentración de calcio en los flóculos. El de mayor contenido de calcio fue FL1 con 61,310 ppm, seguido de FL3 con 4,360.15 ppm y FL2 solo mostró 1.3 ppm.

Tabla 7. Concentración de calcio en los flóculos

Flóculo	Concentración de calcio (ppm)
FL 1	61,310
FL 2	1.3
FL 3	4,360

10. CARACTERIZACIÓN DE LOS FLÓCULOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Las bandas intensas de FL1 y FL2 en R_f 0.48 y 0.46 respectivamente (Figura 23a), indica que la composición en su mayoría se trata de monosacáridos, lo cual coincide con la concentración inicial de azúcares reductores encontrada en FL1 y FL2 de 67 y 64% respectivamente (Tabla 7). De forma contraria, el hecho de que FL3 muestra solamente una tenue banda en R_f 0.46 y el resto permanece en el origen (Figura 23a), indica la presencia de oligosacáridos, que se confirma con la concentración inicial de azúcares reductores de 3% (Tabla 7). Al comparar las bandas de los flóculos con los estándares de carbohidratos podemos decir que las bandas en R_f 0.55 y 0.53 de los flóculos (Figura 23a) podrían corresponder a xilosa; así mismo, las bandas en 0.48 y 0.46 están en el rango de la fructosa y la glucosa (Figura 23b).

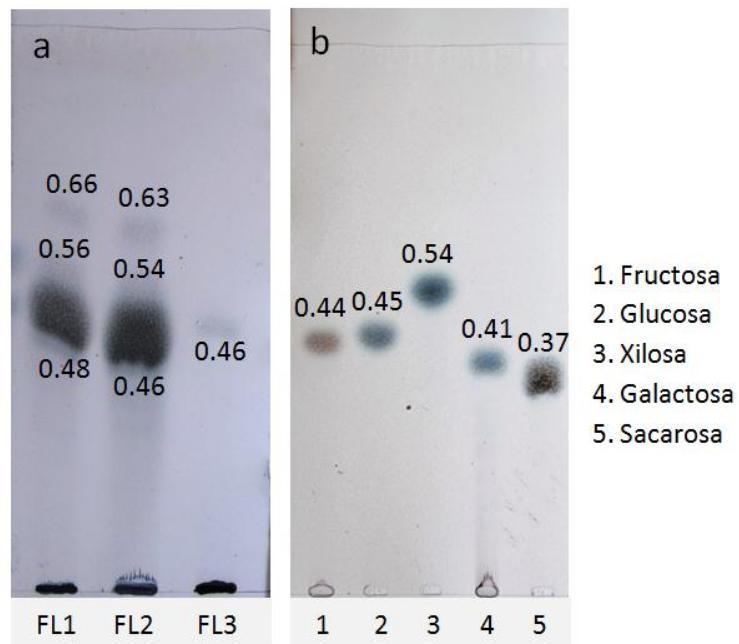


Figura 23. (a) Patrón cromatográfico de los flóculos antes de ser hidrolizados; (b) patrón cromatográfico de diferentes carbohidratos.

El siguiente cromatofolio muestra la separación de los componentes del extracto de butanol de FL1 en el que se puede observar que todas las bandas tienen el color característico de la fructosa revelada por la técnica de anilina-fenilamina. Por la intensidad de la banda en R_f 0.44 podemos asumir que el extracto está formado principalmente por fructosa libre y oligómeros de fructosas, y que la fructosa en los flóculos proviene de los residuos de jarabe (Figura 24).

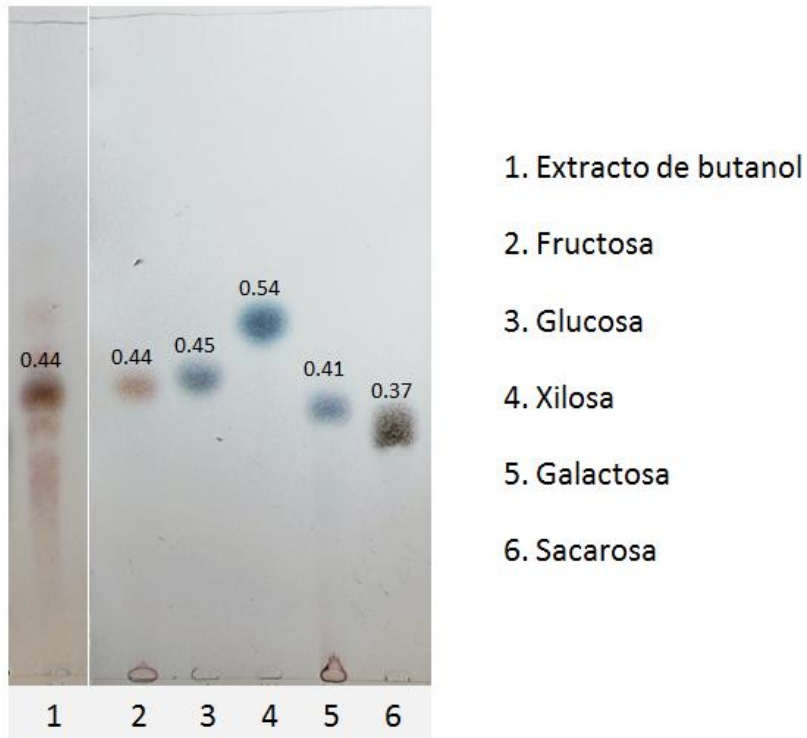


Figura 24. Perfil cromatográfico del extracto de butanol de FL1 que muestra monómeros y oligómeros de fructosa.

10.1 Hidrólisis enzimática

Hidrólisis con mezcla de enzimas: hemicelulasa, laminarina, pectinasa, celulasa e inulina. En la **Figura 25** se observa el patrón de bandas generado por la hidrólisis enzimática de los tres flóculos. El carril 5 y 6 muestran el patrón de bandas de FL1 no hidrolizado e hidrolizado respectivamente. FL1 no hidrolizado (carril 5) muestra una banda intensa en R_f 0.41 y otra en el origen; FL1 hidrolizado (carril 6) muestra bandas en 0.41, 0.28 y otras bandas más tenues más cercanas al origen. De la misma forma que en FL1 se presentan las bandas para FL2 y FL2 hidrolizado (carriles 7 y 8 respectivamente). En el caso de FL3 sin hidrolizar (carril 9) se observa sólo una tenue banda en R_f 0.41, y después de la hidrólisis (carril 10) aparecen al menos tres bandas visibles en R_f 0.44, 0.41 y 0.28. La hidrólisis ácida de en La

atenuación de la banda en el origen y la presencia de bandas en FL1 y FL2 hidrolizados es indicativo de hidrólisis, pero también de la presencia de las enzimas, que como se muestra en la Figura 27 también tienen un patrón de bandas propias de las enzimas.

Por el R_f de las bandas superiores podría tratarse de una mezcla de sacarosa, maltosa y galactosa, pero el análisis por DNS mostró en FL1 y FL2 un porcentaje de azúcares reductores superior al 65% (Tabla 7) también hay que tomar en cuenta que una alta concentración de muestra en la placa puede impedir la migración de los compuestos hacia la parte superior de la misma, pudiendo tener monosacáridos como glucosa y fructosa aunque su R_f sea menor.

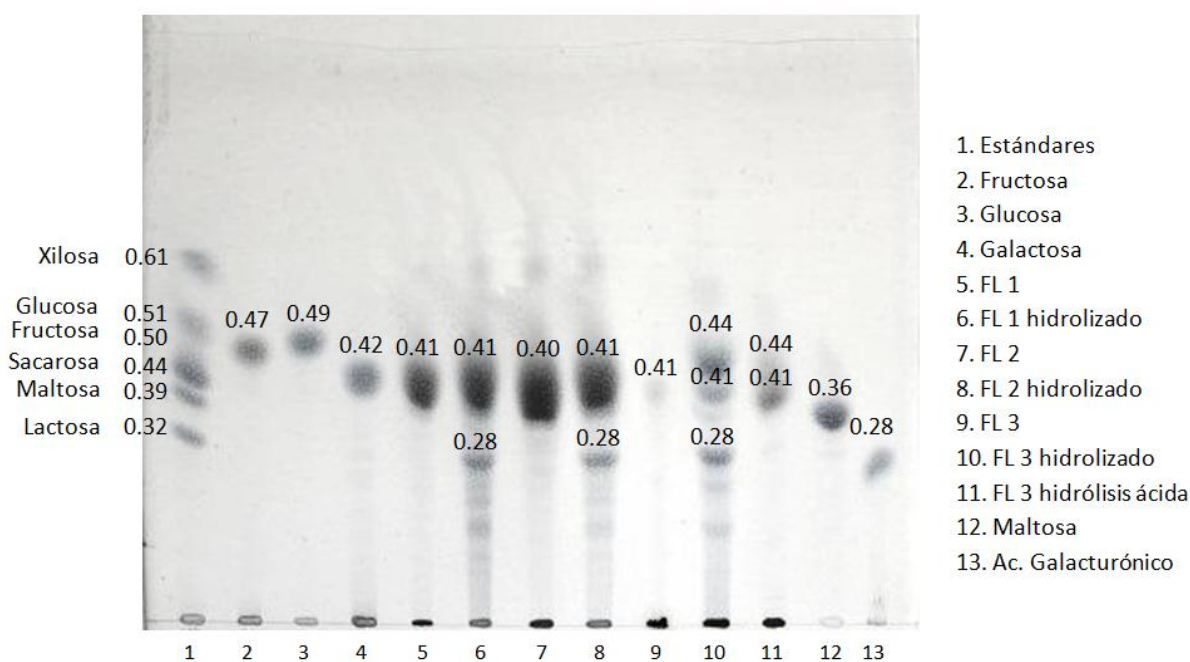


Figura 25. Hidrólisis con mezcla de diferentes enzimas: hemicelulasa, laminarina, pectinasa, celulasa e inulina.

El perfil de bandas de FL3 muestra dos bandas visibles en R_f 0.44 y 0.41, y al igual que en FL1 y FL2, también se presenta una banda en R_f 0.28, equivalente a la de ácido galacturónico (Figura 25), lo que nos sugiere la presencia de pectina en los flóculos. Sin embargo, el perfil de bandas de las enzimas (Figura 27) muestra una banda en R_f 0.30 para laminarinasa y pectinasa, por lo que en el hidrolizado podría tratarse de la banda correspondiente a la enzima y no al ácido galacturónico. Solamente FL3 fue hidrolizado con una enzima a la vez (Figura 26) debido a la disponibilidad de la muestra. De forma cualitativa podemos observar una mayor hidrólisis de FL3 por laminarinasa y celulasa (carriles 10 y 12), pues con estas dos enzimas se generó un mayor número de bandas. Tanto la laminarinasa como la celulasa son endo-glucanasas que hidrolizan los enlaces β -1,3 y β -1,4 (en el caso de la laminarinasa) y enlaces β -1,4 de β -glucanos (en el caso de la celulasa), por lo que podemos sugerir la presencia de β -glucanos en FL3. Además de que el color azul de las bandas es indicativo de la presencia de oligómeros que contienen glucosa.

Para cuantificar la hidrólisis, se analizó el contenido de azúcares reductores de los flóculos que fueron hidrolizados con el coctel enzimático. Encontramos que el porcentaje de hidrólisis fue de 22.1, 22.6 y 19.4 % para FL1, FL2 y FL3 respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación de hidrólisis enzimática de FL1, FL2 y FL3.

Muestra	Contenido inicial de AR (%)	Contenido de AR después de hidrólisis (%)	% de hidrólisis
FL1	67.3 ± 1.8	89.4 ± 7.7	22.1
FL2	74.5 ± 3.3	87.1 ± 3.2	22.6
FL3	2.8 ± 0.5	22.2 ± 1.1	19.4

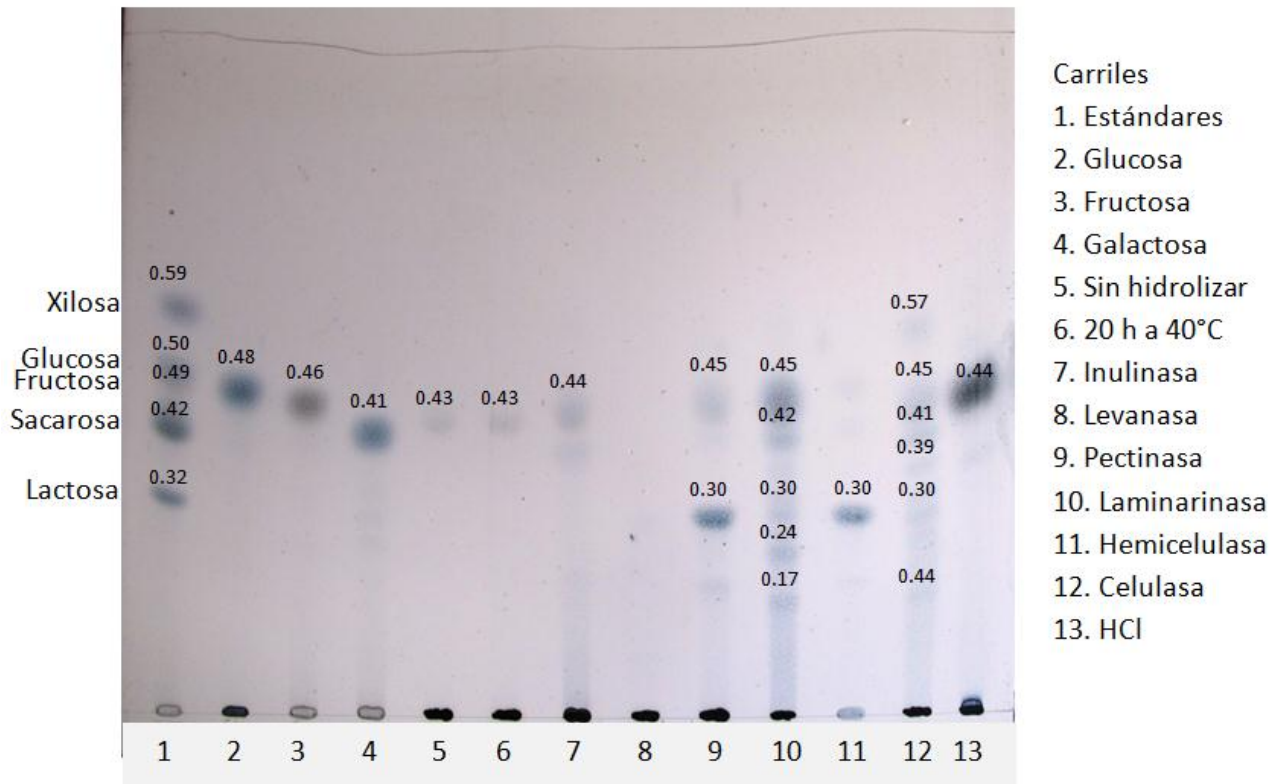


Figura 26. Hidrólisis de FL3 con diferentes enzimas

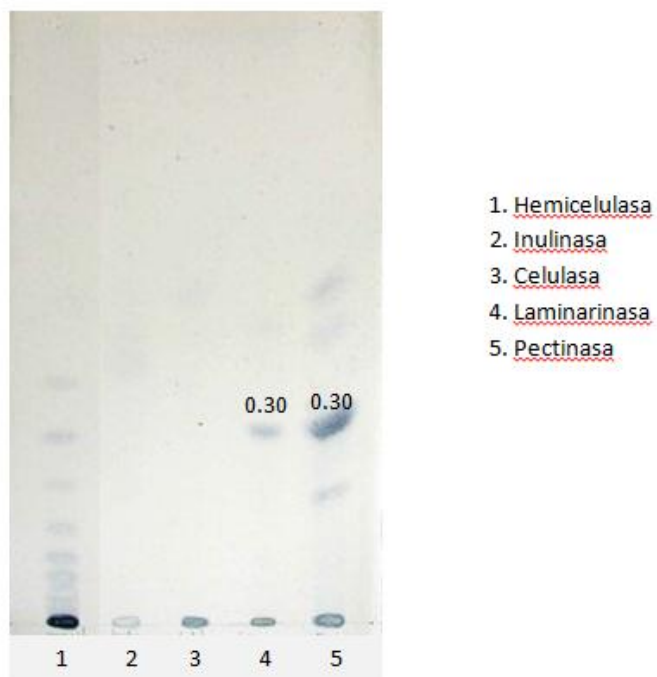


Figura 27. Perfil cromatográfico de las enzimas utilizadas para la hidrólisis de los flóculos.

10.2 Hidrólisis ácida

Se determinó la concentración inicial de azúcares reductores en los tres flóculos. FL1 tiene una concentración de 0.67 g por gramo de flóculo (67%); FL2 tiene una concentración de 0.75 g (75%) y FL3 contiene 0.3 g por gramo de flóculo (3%). El incremento en los azúcares reductores después de la hidrólisis se muestra en la **Tabla 9**, donde FL1 mostró una hidrólisis del 15%, FL2 del 5% y FL3 mostró la mayor hidrólisis con un (43%). Este incremento de azúcares reductores después de la hidrólisis sugiere la presencia de polisacáridos en los flóculos, sin embargo no conocemos la identidad del o los carbohidratos que los componen (**Tabla 9**).

Tabla 9. Porcentaje de azúcares reductores (AR) en los flóculos antes y después de la hidrólisis ácida.

Muestra	Contenido inicial de AR (%)	Contenido de AR después de hidrólisis (%)	% de hidrólisis
FL1	67.3 ± 1.8	85.5 ± 1.4	18.2
FL2	74.5 ± 3.3	83.3 ± 5.5	8.8
FL3	2.8 ± 0.5	46.3 ± 3.0	43.5

Hidrólisis ácida de lámina blanca. La Figura 28 muestra la cromatoplaqueta de la hidrólisis de las láminas blancas de FL1 y FL2. Se observa de forma muy clara que las láminas sin hidrolizar permanecen en el origen (carriles 7 y 9). En cambio después de la hidrólisis se observa un patrón de bandas igual para ambas láminas. Las bandas en R_f 0.41 y 0.40 de los carriles 8 y 10 corresponden a glucosa y las bandas en R_f 0.39 y 0.38 a fructosa, pues si comparamos con los estándares en la misma placa vemos prácticamente el mismo R_f y el color café en el caso de la fructosa es muy característico. Las bandas inferiores tanto de FL1 como de FL2 sugieren la presencia de glucanos por el color azul que presentan.

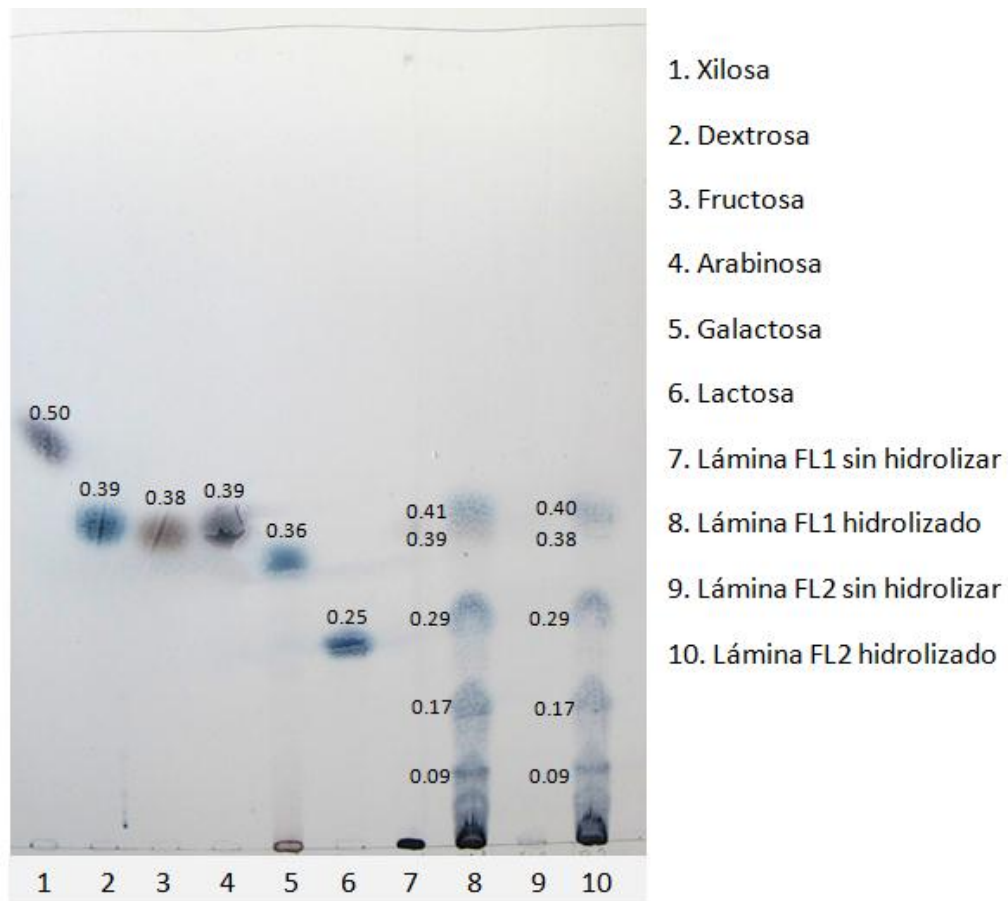


Figura 28. Cromatoplaca de la hidrólisis ácida de las láminas blancas de FL1 y FL2.

11. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA DISPERSANTE DE RAYOS X (SEM/EDS)

11.1 Lámina blanca de FL1 y FL2

La Figura 29 muestra la superficie de la lámina de FL1 a diferentes grados de amplificación. Las 29a y 29b nos permiten observar un patrón reticular en la lámina de FL1 que se asemeja a unas micrografías de sílice reportadas por Thakur (2010). La lámina de FL2 Figura 30d muestra un patrón reticular más compactado que el de FL1. No hubo detección de calcio en la muestra con este método.

El análisis por SEM/EDS (Figura 29c), arrojó los siguientes resultados respecto a la composición elemental de la lámina FL1: Hierro $17.66 \pm 0\%$, Oxígeno $37.54 \pm 2.39 \%$, Carbono $46.20 \pm 5.08\%$, Aluminio $13.99 \pm 0\%$ y Silicio $6.95 \pm 1.48\%$. Casi el 50% de la muestra corresponde a carbono, lo que nos indica la presencia de materia orgánica en la muestra. De acuerdo con los resultados de la hidrólisis, esta presencia de carbono podría deberse a polisacáridos.

En el caso de FL2, la composición corresponde a: Hierro 32.22%, Oxígeno $48.27 \pm 2.38 \%$, Carbono $19.17 \pm 1.20\%$ y Silicio $24.5 \pm 2.85\%$ (Figura 30c). A diferencia de FL1, en esta muestra el contenido de sílice es mayor y el de carbono disminuye, sugiriendo un menor contenido de materia orgánica. Estas diferencias en la composición podrían deberse a los métodos de aislamiento usados para cada flóculo.

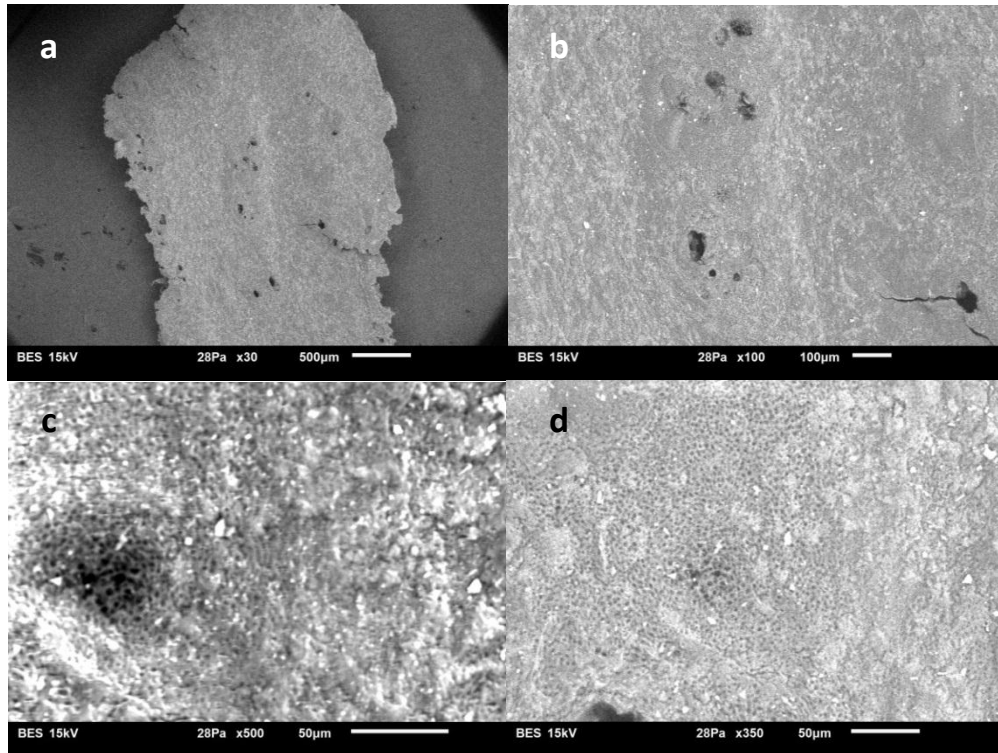


Figura 29. Micrografías de la superficie de la lámina de FL1.

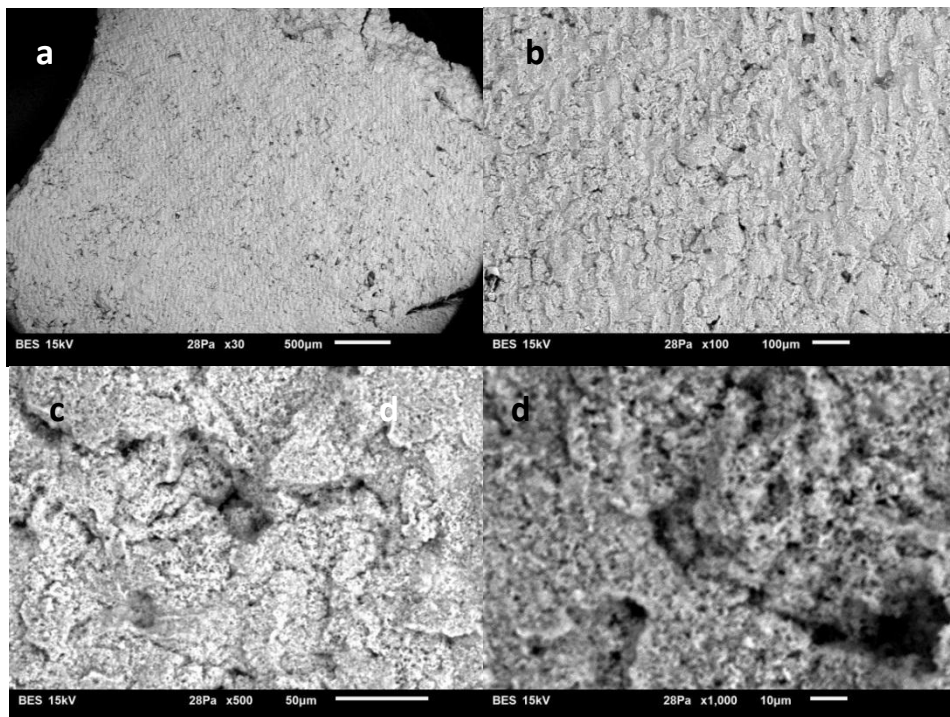


Figura 30. Micrografías de la superficie de la lámina de FL2.

11.2 Residuo de extracciones con solventes

En el caso del residuo de FL1 después de las extracciones con los diferentes solventes, el análisis por SEM/EDS reporta un contenido de Oxígeno de $39 \pm 0.18\%$, Carbono $52 \pm 0.95 \%$, Aluminio 0.6% y Silicio $8.12 \pm 0.84\%$. Esto indica que aproximadamente la mitad del residuo contiene materia orgánica insoluble en agua y en solventes orgánicos (Figura 31).

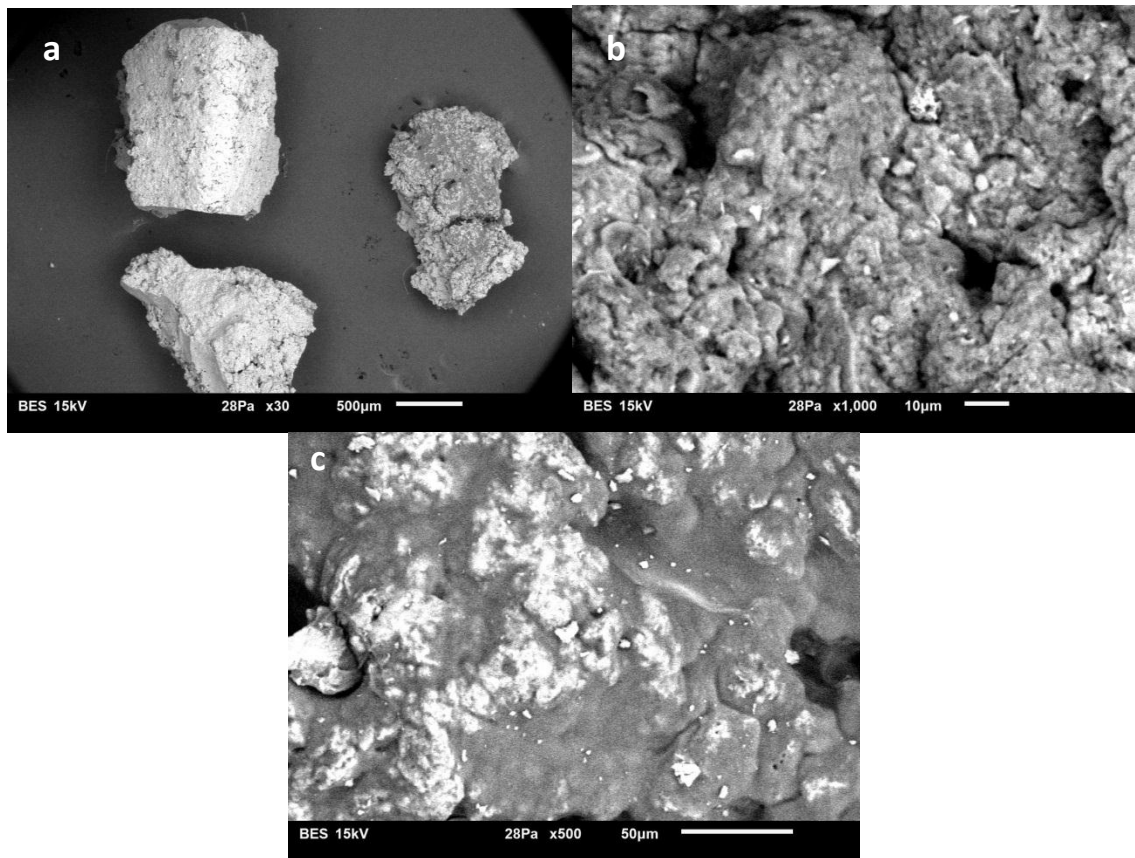


Figura 31. Micrografías de la superficie del residuo insoluble de las extracciones de FL1.

12. CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA

La observación de que los flóculos son capaces de formar complejos con azul de toluidina marcó la pauta para desarrollar una técnica de cuantificación por espectrofotometría UV-VIS de estos flóculos en el jarabe con el fin de diagnosticar la posibilidad de formación de los flóculos después de los 30 días de fabricación del jarabe.

Las pruebas realizadas de forma preliminar con diferentes concentraciones de jarabe tratado con una solución de azul de toluidina (5 ppm) muestran un precipitado color azul que se incrementa cuando la concentración de jarabe es mayor. De la misma forma, la coloración del sobrenadante disminuye con el incremento del precipitado, lo que nos indica una clara formación de complejo flóculo-azul de toluidina.

En la siguiente gráfica se observa la densidad óptica a 634 nm de una muestra de jarabe con flóculos a diferentes concentraciones. 634 nm es la longitud de onda en la que el azul de toluidina presenta su mayor absorbancia. Conforme incrementa la concentración de jarabe, la absorbancia a 634 nm va disminuyendo, y a su vez se observa el incremento en la absorbancia a 550 nm (Figura 32). Tanto la disminución de la absorbancia a 634 nm como el incremento a 550 nm se detiene cuando la concentración de jarabe se encuentra entre 10 y 20 $\mu\text{l/mL}$, permaneciendo constante a 550 nm aún con la concentración más alta de jarabe 80 $\mu\text{l/mL}$; sin embargo, a 634 nm, la absorbancia vuelve a incrementarse cuando la concentración de jarabe es mayor a 20 $\mu\text{l/mL}$. Esto indica que cerca de los 10 $\mu\text{l/mL}$ sucede la máxima formación

del complejo flóculo-azul de toluidina. Sin embargo, a 634 nm se observa un incremento a los 40 y 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de jarabe. Esto puede suceder debido a la turbidez que se genera al incrementar la concentración de jarabe en la solución.

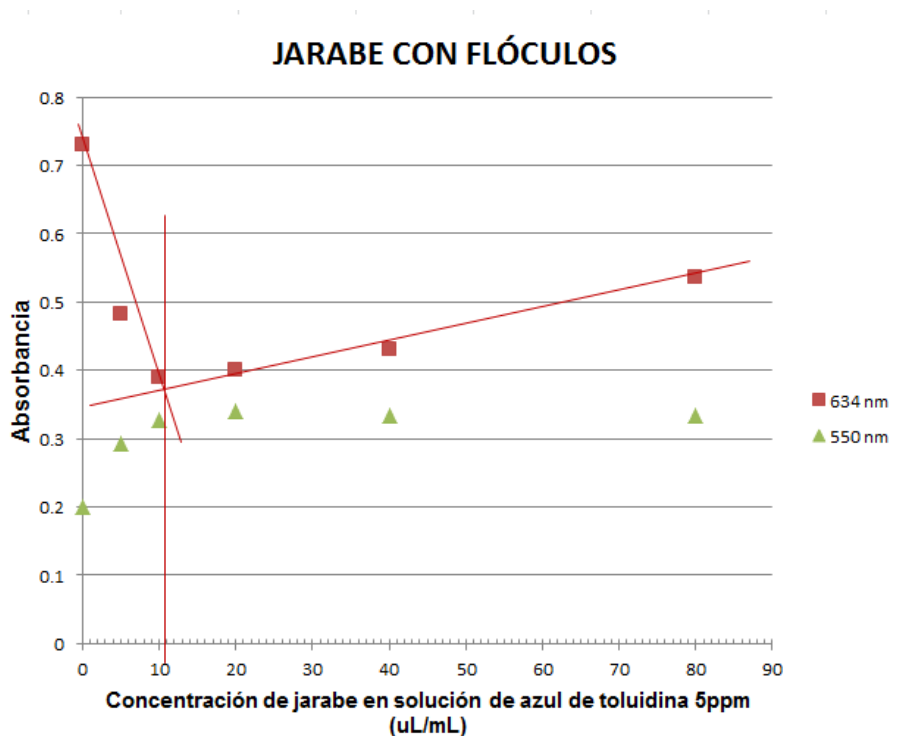


Figura 32. Formación del complejo flóculo-azul de toluidina en un jarabe que contiene flóculos.

En el caso de jarabes que nunca presentaron flóculos, la tendencia en la disminución de la absorbancia al incrementar la concentración de jarabe a 634 nm vuelve a presentarse, sin embargo la absorbancia disminuye menos y la concentración en la que se lograría la absorbancia más baja corresponde a los 240 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figura 33). Las absorbancias a 550 nm son prácticamente iguales a las del jarabe con flóculos. La principal diferencia en comparación con el jarabe que

presenta flóculos es la concentración de jarabe necesario para llegar a la saturación del colorante.

Entonces, tomando en cuenta que la saturación del complejo flóculo-azul de toluidina en un jarabe con flóculos (cf) sucede con 11 $\mu\text{l/mL}$ de jarabe y en un jarabe sin flóculos (sf) sucede a 24 $\mu\text{l/mL}$, y que una molécula de flóculo se une a una molécula de azul de toluidina, la concentración de flóculos de acuerdo a la fórmula $Fl = \frac{16.39}{FAzT_{max}}$ en jarabe con flóculos es de 1.49 mmol/L y en la miel sin flóculos es de 0.68 mmol/L, por lo que la concentración crítica de formación deberá estar entre estas dos.

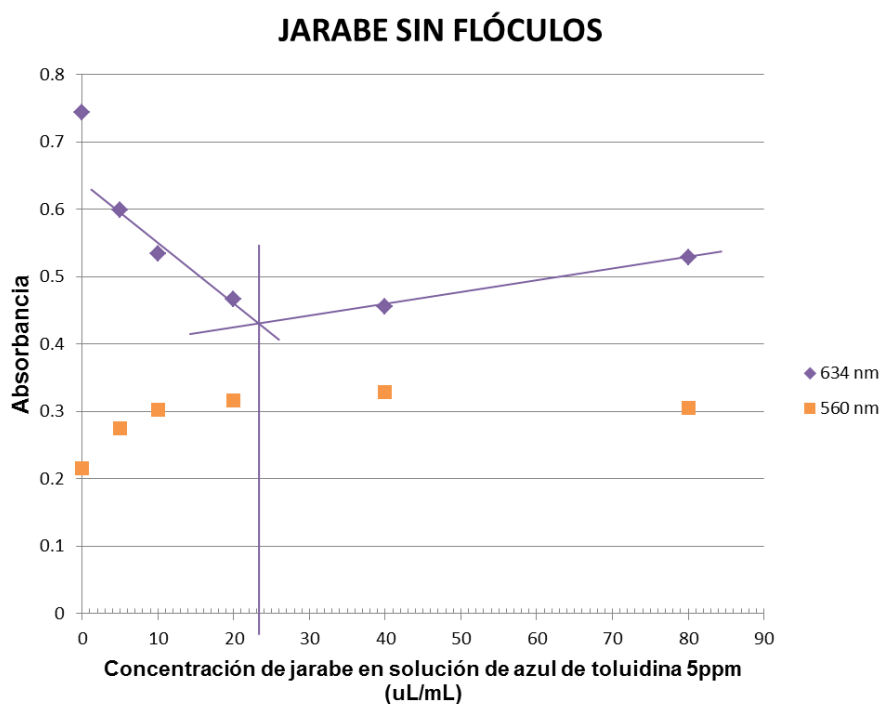


Figura 33. Formación del complejo flóculo-azul de toluidina en un jarabe que contiene flóculos.

DISCUSIONES

1. AISLAMIENTO: OBSERVACIÓN Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS FLÓCULOS DEL JARABE

Tanto el azul de toluidina como el azul de metileno son colorantes catiónicos con afinidad hacia superficies que tengan una carga aniónica (Sridharan y Shankar, 2012). El sílice contenido en los flóculos podría ser el responsable del comportamiento aniónico de los flóculos, pues está cargado negativamente.

La tinción de los flóculos con el azul de toluidina genera la formación de un precipitado color azul que no se forma al teñirlos con el azul de metileno. Si comparamos ambos colorantes encontramos que la única diferencia entre ambos es la presencia del grupo metilo en el azul de toluidina (Figura 34). Por lo anterior, la formación del complejo flóculo-azul de toluidina podría deberse principalmente a la atracción por la carga positiva del colorante con la negativa del flóculo, además de la afinidad con el grupo metilo. Ya que los grupos metilo son muy afines a los compuestos orgánicos y sabemos que los flóculos tienen componentes de este tipo, podemos entender que la afinidad sea mayor hacia el azul de toluidina.

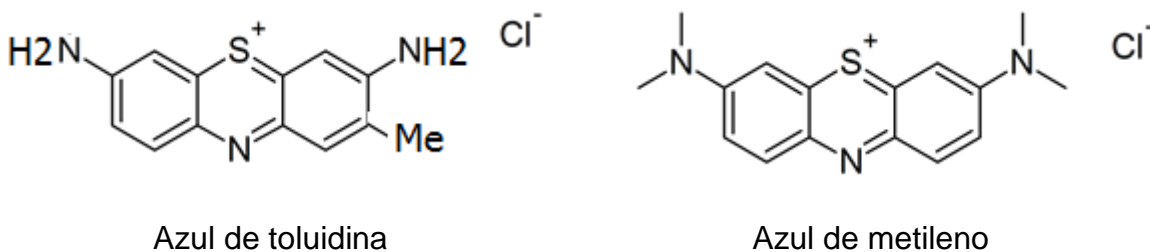


Figura 34. Estructura química del azul de toluidina y del azul de metileno

Además, debido a que el jarabe de agave es de origen vegetal, los componentes orgánicos en los flóculos podrían tener su origen en la materia prima que es el agave. El azul de toluidina es un colorante muy utilizado para la tinción de tejidos tanto animales como vegetales. La tinción de los flóculos con este colorante dio una coloración violeta (Figura 4b), y de acuerdo a reportes previos, en un tejido de pared vegetal, la tinción con azul de toluidina que resulta en un color rosa-violeta indica la presencia pectinas (Botha y Cutler, 2007), como pudo confirmarse en la prueba de determinación de ácido galacturónico. El color café-rojizo de los flóculos teñidos con la solución de yodo puede indicar la presencia de polisacáridos con diferente estructura del almidón como la amilopectina, celulosa y glucógeno (Timberlake 2007), y aunque no conocemos la identidad de los oligómeros detectados podría tratarse de alguno de este tipo de polisacáridos. La observación de hilos o fibras interconectadas por pequeñas esferas teñidas con yodo (Figura 5) sugieren que estas esferas interconectan a otros compuestos para formar hilos en un patrón tipo “rosario”. En base a los resultados obtenidos creemos que esas esferas corresponden principalmente a partículas de sílice y los hilos, a los oligosacáridos. Estudios previos han mostrado la fuerte interacción entre nanopartículas de sílice y otros polímeros en la formación de geles, siendo el sílice el punto de unión entre los polímeros, permitiendo modificar las propiedades mecánicas y el entrecruzamiento de dichos polímeros (Gaharwar et al. 2011; Carlsson et al. 2010; Rose et al. 2014).

2. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los procesos de purificación de los flóculos no fueron llevados a cabo de forma simultánea debido a la disponibilidad de dicho material para realizar los análisis. El proceso de purificación para generar FL1 se llevó a cabo en la empresa por el Gerente de Producción a partir de jarabes producidos en 2011. Durante el proceso de purificación se agregó agua a los flóculos para eliminar los restos de miel y la mezcla resultante fue centrifugada para concentrarlos. Debido a esto, el aspecto original de los flóculos vistos al microscopio cambió de forma notoria Figura 35. Mientras que los flóculos sin purificar tienen una estructura interconectada con fibrillas, FL1 tiene una estructura en forma de partículas irregulares en las que no se observan estas fibrillas ni el patrón de rosario como se observa en la Figura 5a y 5b. Además, el color de FL1 es azul, lo que difiere con lo observado al teñir el flóculo sin purificar. La siguiente Figura 35 muestra la tinción de FL1 con azul de toluidina, en la que se pueden observar partículas irregulares aglomeradas.

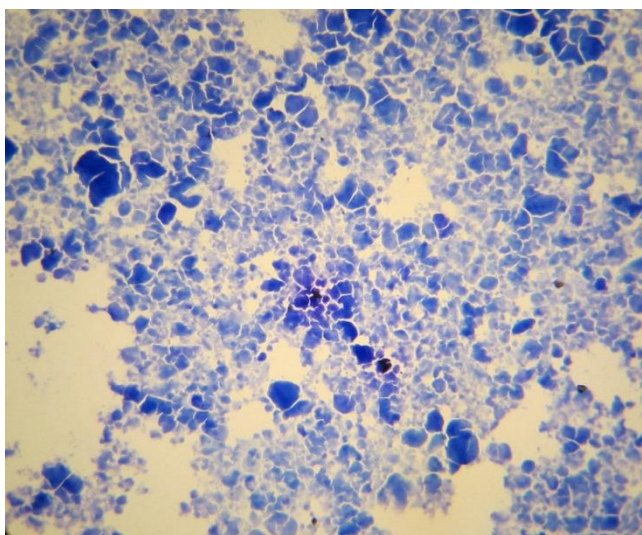


Figura 35. Partículas de FL1 teñidas con azul de toluidina

La purificación de FL2 fue realizada en el laboratorio con un proceso diferente al de FL1 (Figura 7) utilizando jarabes producidos durante 2012, que presentaron un menor número de flóculos en comparación con los producidos en 2010 y 2011. Al teñir FL2 con azul de toluidina, se observan partículas de un azul intenso con estructura similar al flóculo original, con la diferencia en la coloración que en FL2 se presenta azul (Figura 36) en lugar de violeta como con los flóculos sin purificar.

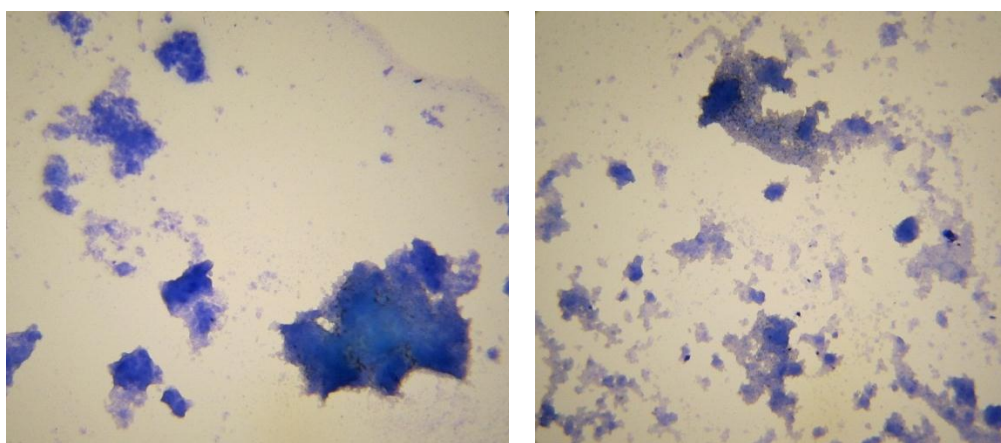


Figura 36. Partículas de FL2 teñido con azul de toluidina.

La purificación de FL3 se llevó a cabo a partir de jarabe producido en 2011, pero a diferencia de FL1, FL3 se purificó utilizando etanol y el producto final consistió en un polvo blanquecino soluble en agua, por lo que creemos que obtuvimos sólo una fracción de los compuestos que forman los flóculos. Aunque no es posible visualizar partículas en microscopio, la tinción con azul de toluidina resulta en una solución color violeta, similar a la que se observó en los flóculos sin purificar.

3. DETERMINACIÓN DE PECTINA

Como se observó en la tinción de los flóculos con azul de toluidina, el color rosa-violeta podría indicar la presencia de pectinas en la muestra, lo cual fue confirmado con el análisis para detección de ácido galacturónico. Es muy bien conocido que la pectina se encuentra presente en las paredes celulares vegetales (Caffall y Mohnen, 2009). Suponemos que la pectina se encuentra esterificada con grupos metilo, pues al hidrolizar solamente con la pectinasa, -incapaz de cortar enlaces éster- la determinación de ácido galacturónico resultó negativa. Sin embargo, al hidrolizar con pectinesterasa, se detectó la presencia de ácido galacturónico en las muestras. Cedeño Cruz y Alvarez-Jacobs (1999) determinaron la composición del bagazo de agave después de la extracción del jugo y encontraron que la pectina representa el 1% del bagazo analizado. El hecho de encontrar pectina presente en los flóculos nos indica que el jugo no se hidroliza por completo durante el tratamiento termoácido, y que este compuesto podría contribuir a la formación de los flóculos al funcionar como una matriz en la cual otros componentes de los flóculos podrían estarse agregando. Se conoce que en las paredes celulares vegetales, la pectina funciona como una matriz en la que se encuentran embebidos otros componentes de la pared como celulosa, hemicelulosa y proteínas (Caffall y Mohnen, 2009).

4. CONTENIDO DE CENIZAS EN FL1 y FL2

El contenido de cenizas en las muestras confirma la presencia de componentes inorgánicos en los flóculos. Si tomamos en cuenta que el 67.57% de FL1 es agua, la concentración de cenizas en base seca sería del 8.5%, por lo que los compuestos inorgánicos son una parte importante en la composición de los flóculos. FL2 proviene de flóculos de jarabes producidos en 2012, los cuales se presentan en menor cantidad y tamaño, y que prácticamente no contiene calcio, lo que se ve reflejado en una menor concentración de cenizas en comparación con FL1.

5. CARACTERIZACIÓN DE FLÓCULOS PURIFICADOS Y SUS EXTRACTOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS (FT-IR)

Al igual que FL1, el espectro de FL2 puede estar indicando la presencia de carbohidratos, ya sea en forma de oligómeros o monómeros. Debido al proceso de hidrólisis termoácida al que se somete el jugo para la producción de jarabe, será poco probable encontrar polisacáridos de cadena larga en los flóculos. Posiblemente se encuentren como oligómeros. Ya que este tipo de análisis no distingue entre polímeros y monómeros no podemos saber de qué tipo de carbohidrato se trata y posiblemente exista una mezcla de varios. Las bandas en FL3 son muy anchas por lo que no es posible decir con certidumbre el tipo de compuestos presentes, sin embargo, con la información de FL1 y FL2 podemos esperar que se trate de oligosacáridos.

5.1 Extractos de flóculos FL1

Extracto soluble en tolueno. No fue posible analizar el extracto por FT-IR debido a la escasez de la muestra.

Extracto soluble en cloroformo. Aunque no se puede decir con certeza que se trate de una cera o un esterol, al ser un extracto liposoluble creemos que podría tratarse de algún lípido de membrana celular del agave, (Gallová et al. 2011). Martínez-Aguilar y Peña-Alvarez, (2009) analizaron la composición de lípidos en diferentes especies de agave mezcalero, y encontraron la presencia de ácidos grasos libres, beta-sitosterol y grupos de mono-, di- y triacilgliceroles. Probablemente durante el proceso de extracción del jugo, que se hace mediante difusor a temperaturas cercanas a los 60°C, pudieron haberse extraído algunas ceras o componentes lipofílicos.

Extracto soluble en Butanol e IPA. Por su similitud con el estándar de fructosa, podemos asegurar que el extracto contiene fructosa, sin embargo, el análisis por FT-IR no arroja información sobre la presencia de polímeros o monómeros en el extracto. Al analizarlo mediante TLC pudimos observar que se trata de oligómeros y fructosas libres principalmente. Esto fue un resultado esperado ya que el origen de la fructosa del jarabe es de un polímero de fructosas y que a su vez representa la mayor fracción de los flóculos. La presencia de la fructosa libre corresponde a los residuos de jarabe en los flóculos, explicando el por qué este extracto fue el de mayor proporción. Además, la presencia de oligofruktanos en el extracto indica que no hubo una hidrólisis total durante el proceso de producción del jarabe.

Residuo insoluble en IPA (lámina blanca) y extracto soluble en agua Tanto la lámina blanca como el extracto de la lámina soluble en agua son prácticamente iguales. Esto nos demuestra que existen componentes de la lámina blanca solubles en agua, y que dichos compuestos son los responsables de la formación de la lámina, pues al tratar la lámina con agua, ésta se desintegró quedando partículas grisáceas. Este resultado es importante, pues este compuesto extraído con agua podría estar jugando un papel importante en la aglomeración de los componentes de los flóculos.

Composición de la fracción insoluble. Al observar la similitud entre los espectros del extracto soluble en agua y la fracción insoluble, podemos decir que la extracción de los compuestos solubles en agua no fue completa. En este residuo el pico en 1049 cm^{-1} es demasiado ancho e inespecífico comparado con el extracto soluble en agua, pudiendo indicar la presencia de diferentes compuestos.

Cenizas de los flóculos. Yu y colaboradores (2004) demostraron que el espectro de FT-IR de silicato de calcio presenta las bandas de absorción en las mismas longitudes de onda que los silicatos, sin embargo, la intensidad de las bandas disminuye conforme la proporción Ca/Si se incrementa y se presenta una banda alrededor de los 300 cm^{-1} que indica la interacción Ca-OH, como muestra la banda intensa en 375 cm^{-1} de FL1 (Figura 21), La presencia de la banda indicativa de calcio en FL1 y su ausencia en FL2 es congruente con los resultados de la cuantificación de calcio en FL1 y FL2: 61,310 ppm y 1.3 ppm respectivamente.

6. CONTENIDO DE SÍLICE Y CALCIO

Los silicatos tienen carga negativa por lo que son capaces de atraer cationes como calcio hasta que alcanzan cierta concentración y propician la coagulación de los silicatos, provocando la polimerización y precipitación en forma de silicatos de calcio (Iler 1975; Sheikholeslamia, Tan, and Tan 2002).

La concentración de sílice en FL1 es la menor de los tres flóculos y su concentración de calcio es la más alta; en cambio FL2, que tiene la concentración de sílice más alta presentó la menor concentración de calcio. Estos resultados nos indican que el sílice podría ser el factor principal responsable de la formación de los flóculos, pues aparecen en el jarabe aunque la concentración de calcio sea muy baja. De cualquier forma, el calcio parece jugar también un papel importante en la desestabilización y coagulación de los silicatos de FL1 provocando la precipitación de silicatos de calcio (Iler 1975). Además, tanto el calcio como los silicatos son capaces de formar complejos con pectina (Grant, et al., 1973; Agoudjil et al., 2012; Assifaoui, et al., 2013) , lo que explica que el tamaño y concentración de los flóculos sea mayor cuando se presenta una mayor concentración de calcio en el producto final. En el caso de FL2, que tiene una concentración de calcio mucho menor que FL1, la polimerización de los silicatos podría estar sucediendo de forma más lenta (Iler 1979), así como la formación de los complejos con pectina, ya que también tiene carga negativa (Pinelo, Zeuner, and Meyer 2010).

Ya que la polimerización de los silicatos es un proceso lento (Iler 1979), el fenómeno de aparición de los flóculos coincide con el comportamiento de los coloides reportado por Iler (1979), en el que los silicatos se van agregando en

dímeros, trímeros, polímeros hasta formar partículas de hasta 100 μm (sol) o agregados de muchas partículas de menor tamaño (5-30 nm) (gel), las cuales tienden a precipitar. Si estas partículas de sílice se unen con cationes como el calcio, se genera la coagulación de los silicatos acelerando su precipitación (Sheikholeslamia, Tan, and Tan 2002). Mientras menor sea el tamaño de partícula de los silicatos, mayor será la concentración de calcio necesaria para lograr la coagulación y precipitación (Iler, 1979). Además, el pH también influye en la solubilidad de los silicatos: ésta se incrementa gradualmente a pH mayor a 9, pero disminuye drásticamente en pH menor a 7 (Weber 1979). El jarabe obtenido de IMAG tiene un pH de entre 4.5 y 5 (Mellado-Mojica y López-Pérez, 2013), lo que puede estar influyendo en la formación y precipitación de los flóculos.

Durante el proceso de producción de jarabe, el jugo es tratado por resina catiónica fuerte para retener los cationes, principalmente calcio por su doble carga, pero también sodio y potasio. Posteriormente el jugo pasa por resina aniónica débil para atrapar aniones. Cuando el sílice se encuentra en su forma coloidal o “no activa” la resina no es capaz de atraparlo, pudiendo pasar a través de ella hasta el producto final.

Si bien es cierto que el problema ha disminuido con la implementación de medidas más estrictas en el control de calidad tales como la reducción del período de tiempo entre la recepción y el procesamiento de las piñas, un mayor rechazo de piñas con síntomas de enfermedad y un mejor control en la calidad y el rendimiento de las resinas; se siguen presentando flóculos en menor concentración y con menor frecuencia.

6.1 Sílice en agua de pozo y jugo

La ausencia de sílice en el jugo recién extraído de la piña nos sugiere que la fuente de silicio proviene del agua de pozo utilizada en el difusor para extraer el jugo de la piña. Los resultados de la cuantificación de sílice en el agua de pozo utilizada en el proceso de producción del jarabe confirman esta idea, incluyendo el análisis en el agua de pozo tratada con el suavizador, en el que se prueba que el tratamiento del agua no es capaz de eliminar la sílice, ya que muy probablemente se encuentre en forma coloidal o no activa para poder hacer el intercambio con el sodio.

7. CARACTERIZACIÓN DE LOS FLÓCULOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

7.1 Hidrólisis enzimática

En el trabajo de Mellado-Mojica y López- Pérez (2013) se realizó un perfil cromatográfico por TLC de diferentes jarabes de agave, de maíz y miel de abeja visualizados por la misma técnica que la utilizada en este trabajo. Sus resultados muestran que la fructosa y los fructooligosacáridos se visualizan de color rojizo, a diferencia de la glucosa y los oligosacáridos de glucosa que presentan bandas color azul.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa el patrón de bandas generado por la hidrólisis enzimática de los tres flóculos. Ya que el color de las bandas es azul-grisáceo, sospechamos de la presencia de glucanos y otras aldosas, pero no oligómeros de fructosa, pues estos últimos se observarían color café-rojizo (Kocourek and Kostir 1966; Erika Mellado-Mojica and López-Pérez 2013).

7.2 Hidrólisis ácida

Hidrólisis ácida de lámina blanca. El tratamiento con HCl de las láminas permitió observar una serie de bandas que indican la presencia de oligómeros en las muestras, pues al inicio de la hidrólisis la muestra permanece en el origen. Las bandas azules que se observan al hidrolizar las láminas podrían tratarse de oligómeros de glucanos, pues la reacción del grupo carbonilo de la glucosa con los grupos amino de la anilina y la difenilamina dan lugar a bandas color azul, y con la fructosa producen un color marrón-rojizo, tanto monómeros como oligómeros (Erika Mellado-Mojica and López-Pérez 2013; Kocourek and Kostir 1966). Es importante mencionar que en el extracto de butanol de FL1 se observan bandas color café rojizo que indican la presencia de oligómeros de fructosa en los flóculos (Figura 24).

La interacción de los oligómeros de glucosa, fructosa y pectina junto con el sílice para formar las láminas blancas nos sugiere que el sílice juega un papel determinante como punto de unión entre los oligómeros. Esta idea es consistente con lo reportado por Rose y colaboradores, (2014). Ellos demostraron que la unión de diferentes polímeros solamente es posible en la presencia de soluciones de nanopartículas de sílice.

Algo similar a lo anterior podría estar sucediendo durante el proceso de formación de los flóculos: el sílice en suspensión se comporta como punto de unión entre los oligómeros residuales del jarabe, provocando su agregación paulatina hasta formar aglomerados visibles que denominamos como flóculos.

8. CARACTERIZACIÓN DE LOS FLÓCULOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA DISPERSANTE DE RAYOS X (SEM/EDS)

8.1 Lámina blanca de FL1 y FL2

El patrón reticular que se presenta en las láminas blancas de FL1 y FL2 se asemeja al de sílice, reportado por Thakur (2010) (Figura 37). El análisis EDS detectó la presencia de Silicio en ambas muestras, además de otros elementos como Oxígeno, Carbono, Hierro y Aluminio. La presencia de Carbono indica materia orgánica en la muestra. El hierro y el aluminio podrían ser impurezas presentes en las láminas, pues el análisis de los elementos abarca sólo 4 puntos de la muestra. De forma inesperada, el análisis por EDS no detectó la presencia de Calcio en FL1. Esto podría explicarse de dos formas: i) los componentes de la lámina no se distribuyen homogéneamente en la muestra y por eso no fue posible detectarlo; ii) el calcio no se encuentra unido al sílice en forma de silicato, pudiendo actuar sólo como catalizador de la formación de los flóculos (Sheikholeslamia, Tan, and Tan 2002).

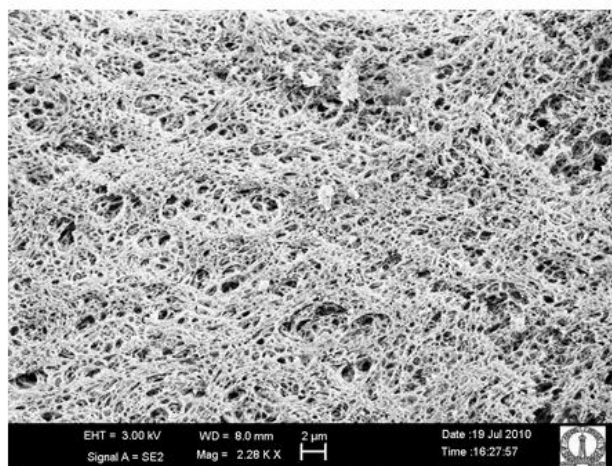


Figura 37. Imagen de sílice por SEM. Tomado de (Thakur 2010).

8.2 Fracción final insoluble

Las imágenes no presentan el patrón reticulado de las láminas, sin embargo el análisis por EDS detectó nuevamente la presencia de Silicio, Oxígeno, Carbono y Aluminio. Esto podría indicar que la composición es muy parecida a la de las láminas.

Hemos observado que cuando estas láminas blancas son tratadas con agua se desintegran, quedando partículas insolubles grisáceas. Creemos que el agua está extrayendo compuestos responsables de la formación de la lámina blanca, y que estos compuestos podrían ser oligómeros de glucanos y fructanos. Una evidencia de esta afirmación es el análisis por TLC que se realizó a las láminas blancas (Figura 28), en las que se observa un patrón de bandas correspondientes a glucanos y fructosa (Erika Mellado-Mojica and López-Pérez 2013; Kocourek and Kostir 1966) después de haber sometido a dichas láminas a hidrólisis ácida. Las láminas sin hidrolizar, solamente presentaron una banda en el origen, indicando que se trata de compuestos polimerizados, y que estos compuestos podrían ser los responsables de la formación de la lámina.

Este tipo de interacción también sucede con otros polímeros, en los cuales el sílice funciona como punto de unión entre polímeros, aumentando la adhesividad entre los polímeros y dando consistencia rígida o elástica a la lámina (Carlsson, et al., 2010; Gaharwar, et al., 2011).

9. CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA

En el jarabe que presenta flóculos, la mayor absorbancia observada a 550 nm coincide con la menor absorbancia observada a 634 a una concentración de jarabe de 11 $\mu\text{g/mL}$, indicando la máxima formación del complejo flóculo-azul de toluidina a esa concentración, pues al seguir incrementándola, no aumenta la absorbancia a 550 nm. Lo contrario sucede a 634 nm, lo que nos hace suponer que el incremento en la absorbancia se debe a un incremento en la turbidez del sobrenadante al agregar más jarabe.

En el caso del jarabe sin flóculos, la máxima formación del complejo flóculo-azul de toluidina sucede a una concentración de jarabe de 24 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica que mientras menos componentes de flóculos haya en el jarabe, la absorbancia del azul de toluidina tenderá a permanecer cercana a la del azul de toluidina sin jarabe, pues casi no habrá flóculos que “atrapen” las moléculas de azul de toluidina para precipitarlas, y que provoquen la disminución de color en el sobrenadante que se refleja en una menor absorbancia a 634 nm.

Es necesario repetir estas pruebas con un mayor número de jarabes para poder determinar la concentración crítica de oligosacáridos y sílice antes de que formen flóculos visibles en el producto final.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos concluir que los flóculos están compuestos una fracción orgánica y una inorgánica. La fracción orgánica consiste en oligómeros de fructosa, oligómeros de glucosa, pectina y una mínima concentración de ácidos grasos. La fracción inorgánica consiste principalmente en sílice y calcio, con presencia de hierro y aluminio.

El origen de la fracción orgánica de los flóculos es el agave, que constituye la materia prima principal del jarabe, pues dichos componentes forman parte de la pared celular vegetal (pectina y glucanos) y de los carbohidratos de reserva de la planta (fructanos).

El sílice juega un papel determinante en la formación de los flóculos al funcionar como centro de unión entre el resto de los componentes de los flóculos.

El origen del sílice en los flóculos es el agua de pozo que se utiliza en el difusor para la extracción del jugo.

La concentración de calcio en el jarabe parece estar relacionada con la velocidad de precipitación y tamaño de los flóculos, por lo que juega un papel importante en la formación de los flóculos, sin embargo, no es determinante para su formación, pues al estar prácticamente ausente, estos continúan formándose.

La interacción entre el sílice y los biopolímeros nos abre un campo de investigación de gran interés bajo el enfoque en la síntesis de películas con una posible aplicación en la industria alimenticia.

BIBLIOGRAFIA

- Agoudjil, Nouria, Clémence Sicard, Vincent Jaouen, Catherine Garnier, Estelle Bonnin, Nathalie Steunou, and Thibaud Coradin. 2012. "Design and Properties of Biopolymer–silica Hybrid Materials: The Example of Pectin-Based Biodegradable Hydrogels." *Pure and Applied Chemistry* 84 (12). International Union of Pure and Applied Chemistry: 2521–29. doi:10.1351/PAC-CON-11-11-18.
- Allsopp, Philip, Sam Possemiers, David Campbell, Iván Saldaña Oyarzábal, Chris Gill, and Ian Rowland. 2013. "An Exploratory Study into the Putative Prebiotic Activity of Fructans Isolated from Agave Angustifolia and the Associated Anticancer Activity." *Anaerobe* 22 (August): 38–44. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.05.006.
- Anderson, K, S C Li, and Y T Li. 2000. "Diphenylamine-Aniline-Phosphoric Acid Reagent, a Versatile Spray Reagent for Revealing Glycoconjugates on Thin-Layer Chromatography Plates." *Analytical Biochemistry* 287 (2): 337–39. doi:10.1006/abio.2000.4829.
- Assifaoui, Ali, Frédéric Bouyer, Odile Chambin, and Philippe Cayot. 2013. "Silica-Coated Calcium Pectinate Beads for Colonic Drug Delivery." *Acta Biomaterialia* 9 (4): 6218–25. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112005818>.
- Barclay, Thomas, Milena Ginic-markovic, Peter D Cooper, Nikolai Petrovsky, and Review Article. 2012. "The Chemistry and Sources of Fructose and Their Effect on Its Utility and Health Implications ." 3 (June): 67–82.
- Baston, Octavian, and Camelia Neagu. 2013. "Establishing the Optimal Conditions for Fructose Production from Chicory Inulin." *Romanian Biotechnological Letters* 18 (3): 8263–70.
- Botha, Ted, and David Cutler. 2007. "Cell Wall Histochemistry." *The Virtual Plant*. <http://virtualplant.ru.ac.za/Main/FACTFILE/Histochem.htm>.
- Bray, George A., Samara Joy Nielsen, and Barry M Popkin. 2004. "Consumption of High-Fructose Corn Syrup in Beverages May Play a Role in the Epidemic of Obesity." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (April): 537–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051594>.
- Caffall, Kerry Hosmer, and Debra Mohnen. 2009. "The Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall Pectic Polysaccharides." *Carbohydrate Research* 344 (14). Elsevier Ltd: 1879–1900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021.

- Carlsson, Linn, Séverine Rose, Dominique Hourdet, and Alba Marcellan. 2010. "Nano-Hybrid Self-Crosslinked PDMA/silica Hydrogels." *Soft Matter* 6 (15): 3619. doi:10.1039/c0sm00009d.
- Cedeño Cruz, M, and J Alvarez-Jacobs. 1999. "Production of Tequila from Agave: Historical Influences and Contemporary Processes." In *The Alcohol Textbook*, edited by K. A. Jacques, T. P. Lyons, and D. R. Kelsall, 2nd ed., 225–41. Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- CEDRSSA. 2014. *Análisis de La Producción Y El Mercado Azucarero En México*. México, D.F.
- Chaira, Nizar, Issam Smaali, Samaher Besbes, Abdessalem Mrabet, Belgacem Lachiheb, and Ali Ferchichi. 2011. "Production of Fructose Rich Syrups Using Invertase From Date Palm Fruits." *Journal of Food Biochemistry* 35 (6): 1576–82. doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00487.x.
- Chi, Zhenming, Zhe Chi, Tong Zhang, Guanglei Liu, and Lixi Yue. 2009. "Inulinase-Expressing Microorganisms and Applications of Inulinases." *Applied Microbiology and Biotechnology* 82 (2): 211–20. doi:10.1007/s00253-008-1827-1.
- CONADESUCA. 2013. *ESTIMADO DEL BALANCE NACIONAL DE EDULCORANTES ZAFRA 2012/2013*. México, D.F.
- Fathi, G, M Labbafi, K Rezaei, Z Emam-Djomeh, and M Hamedi. 2013. "Decolorization of Iranian Date Syrup by Ultrafiltration." *J. Agr. Sci. Tech.* 15: 1361–71.
- Fleming, S E, and J W GrootWassink. 1979. "Preparation of High-Fructose Syrup from the Tubers of the Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus* L." *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12 (1): 1–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/41685>.
- Gaharwar, Akhilesh K, Christian P Rivera, Chia-Jung Wu, and Gudrun Schmidt. 2011. "Transparent, Elastomeric and Tough Hydrogels from Poly(ethylene Glycol) and Silicate Nanoparticles." *Acta Biomaterialia* 7 (12). Acta Materialia Inc. 4139–48. doi:10.1016/j.actbio.2011.07.023.
- Gallová, Jana, Daniela Uhríková, Norbert Kučerka, Slavomíra Doktorovová, Sérgio S Funari, José Teixeira, and Pavol Balgavý. 2011. "The Effects of Cholesterol and B-Sitosterol on the Structure of Saturated Diacylphosphatidylcholine Bilayers." *European Biophysics Journal: EBJ* 40 (2): 153–63. doi:10.1007/s00249-010-0635-6.
- García-Herrera, E. Javier, S. de Jesús Méndez-Gallegos, and Daniel Talavera-Magaña. 2010. *EL GENERO AGAVE SPP. EN MÉXICO: PRINCIPALES USOS*

DE IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA Y AGROECOLÓGICA. Edición Es. Vol. 2010. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición.

- Grant, G.T., E.R. Morris, D.A. Rees, P. J.C. Smith, and D. Thom. 1973. "Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model." *FEBS Letters* 32 (1): 195–98.
- Henry, R R, P A Crapo, and A W Thorburn. 1991. "Current Issues in Fructose Metabolism." *Annual Review of Nutrition* 11 (January): 21–39. doi:10.1146/annurev.nu.11.070191.000321.
- Hinman, C., and W. Nelson. 1974. "Process for Purifying Glucose Syrups Containing Fructose". United States of America. <http://www.google.com/patents/US3784409>.
- Hui, Y.H. 2007. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Edited by Y.H. Hui. First. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons. <http://books.google.com/books?id=mnh6aol8iF8C&pgis=1>.
- Hull, Peter. 2011. *Glucose Syrups: Technology and Applications (Google eBook)*. John Wiley & Sons. <http://books.google.com/books?id=ry2E-9y-AkQC&pgis=1>.
- Iler, Ralph K. 1975. "Coagulation of Colloidal Silica by Calcium Ions, Mechanism, and Effect of Particle Size." *Journal of Colloid and Interface Science* 53 (3): 476–88. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002197977590065X>.
- . 1979. "Chapter 3. Polymerization of Silica." In *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*, 172–204. John Wiley & Sons.
- Iñiguez-Covarrubias, G., R. Díaz-Teres, R. Sanjuan-Dueñas, J. Anzaldo-Hernández, and Roger M. Rowell. 2001. "Utilization of by-Products from the Tequila Industry. Part 2: Potential Value of Agave Tequilana Weber Azul Leaves." *Bioresource Technology* 77 (2): 101–8. doi:10.1016/S0960-8524(00)00167-X.
- Kim, C. H., and S. K. Rhee. 1989. "Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin." *Biotechnology Letters* 11 (3): 201–6. doi:10.1007/BF01026059.
- Kocourek, J., and J. Kostir. 1966. "The Use of Diphenylamine-Aniline-Phosphoric Acid Reagent in the Detection and Differentiation of Monosaccharides and Their Derivatives on Paper Chromatograms." *Journal of Chromatography* 24: 117–24.
- Legorreta Peyton, Enrique, and Tetsuya Ogura Fujii. 2002. "Proceso, Composicion Y Usos de Inulina de Agave En Polvo Y Solucion". México. <http://www.google.com/patents/WO2002066517A1?cl=es>.

- Lopez, Mercedes G, Norma A Mancilla-Margalli, and Guillermo Mendoza-Diaz. 2003. "Molecular Structures of Fructans from Agave Tequilana Weber Var. Azul." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (27): 7835–40. doi:10.1021/jf030383v.
- López, Mercedes G, and Judith E Urías-silvas. 2007. "Agave Fructans as Prebiotics" 661 (2).
- Martínez-Aguilar, Juan Fco, and Araceli Peña-Alvarez. 2009. "Characterization of Five Typical Agave Plants Used to Produce Mezcal through Their Simple Lipid Composition Analysis by Gas Chromatography." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5). American Chemical Society: 1933–39. doi:10.1021/jf802141d.
- Mellado-Mojica, E., and M.G. López- Pérez. 2013. "Análisis Comparativo Entre Jarabe de Agave Azul (Agave Tequilana Weber Var. Azul) Y OTROS JARABES NATURALES." *Agrociencia* 47: 233–44.
- Mellado-Mojica, Erika, and Mercedes Gpe. López-Pérez. 2013. "Análisis Comparativo Entre Jarabe de Agave Azul (Agave Tequilana Weber Var. Azul) Y Otros Jarabes Naturales." *Agrociencia* 47: 233–44.
- Michel-Cuello, Christian, Imelda Ortiz-Cerda, Lorena Moreno-Vilet, Alicia Grajales-Lagunes, Mario Moscosa-Santillán, Johanne Bonnin, Marco Martín González-Chávez, and Miguel Ruiz-Cabrera. 2012. "Study of Enzymatic Hydrolysis of Fructans from Agave Salmiana Characterization and Kinetic Assessment." *The Scientific World Journal* 2012 (January): 1–10. doi:10.1100/2012/863432.
- Miller, F. A., and C. H. Wilkins. 1952. "Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions." *Analytical Chemistry* 24 (8): 1253–94. doi:10.1021/ac60068a007.
- Miller, Gail Lorenz. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31 (3): 426–28.
- Moeller, Suzen M, Sandra Adamson Fryhofer, Albert J Osbahr Iii, and Carolyn B Robinowitz. 2009. "The Effects of High Fructose Syrup" 28 (6): 619–26.
- Montañez Soto, José Luis, José Venegas González, Aurea Bernardino Nicanor, and Emma Gloria Ramos Ramírez. 2011. "Enzymatic Production of High Fructose Syrup from Agave Tequilana Fructans and Its Physicochemical Characterization." *African Journal of Biotechnology* 10 (82): 19137–43. doi:10.5897/AJB11.2704.
- Moreno-Vilet, L, M H Garcia-Hernandez, R E Delgado-Portales, N E Corral-Fernandez, N Cortez-Espinosa, M A Ruiz-Cabrera, and D P Portales-Perez. 2014. "In Vitro Assessment of Agave Fructans (Agave Salmiana) as Prebiotics

- and Immune System Activators.” *International Journal of Biological Macromolecules* 63 (February): 181–87. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.10.039.
- Musić, S., N. Filipović-Vinceković, and L. Sekovanić. 2011. “PRECIPITATION OF AMORPHOUS SiO₂ PARTICLES AND THEIR PROPERTIES.” *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28 (01): 89–94.
- Narváez-Zapata, J A, and L F Sánchez-Teyer. 2009. “Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications.” *Recent Patents on Biotechnology* 3 (3): 185–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747148>.
- NMX-AA-051-SCFI-2001. 2001. ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE METALES POR ABSORCIÓN ATÓMICA EN AGUAS NATURALES , POTABLES , RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-051-1981) WATER ANALYSIS - DETERMINATION OF METALS BY ATOMIC ABSORPTION IN NATURAL. México.
- NMX-AA-075-1982. 1992. Norma Mexicana NMX-AA-75-1982 Analisis de Agua-Determinacion de Silice -. México: Diario Oficial de la Federacion.
- Nobel, Park S. 2003. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press. <http://books.google.com/books?id=jdO2U84I6JwC&pgis=1>.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. “Sugar.” In *OECD-FAO Agricultural Outlook 2014-2023*, 1st ed., 249. OECD Publishing. <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/sugar.htm>.
- Ogura, Tetsuya, and Yoshitane Kojima. 2007. “Introduction to Products Made of Agave and Results of Research into Inulin Production and Its Characterization.” *Foods Food Ingredients J. Jpn* 212 (10): 872–84.
- Pinelo, Manuel, Birgitte Zeuner, and Anne S. Meyer. 2010. “Juice Clarification by Protease and Pectinase Treatments Indicates New Roles of Pectin and Protein in Cherry Juice Turbidity.” *Food and Bioproducts Processing* 88 (2-3): 259–65. doi:10.1016/j.fbp.2009.03.005.
- Ricca, Emanuele, Vincenza Calabrò, Stefano Curcio, and Gabriele Iorio. 2007. “The State of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis.” *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (3): 129–45. doi:10.1080/07388550701503477.
- Rose, Séverine, Alexandre PrevotEAU, Paul Elzière, Dominique Hourdet, Alba Marcellan, and Ludwik Leibler. 2014. “Nanoparticle Solutions as Adhesives for Gels and Biological Tissues.” *Nature* 505 (7483): 382–85. doi:10.1038/nature12806.

- Schved, Fernando, and Batia Hassidov. 2008. "Fructose: A High Quality Sweetener Flavor Enhancing, Calorie-Reduction and Impact on Glycemic Load." *AgroFOOD Industri Hi-Tech*.
- Sheikholeslamia, R, S Tan, and S D Tan. 2002. "Some Aspects of Silica Polymerization and Fouling and Its Pretreatment by Sodium Aluminate , Lime and Soda Ash." *Desalination* 150: 85–92.
- SIVASANKAR, B. 2002. "Sugar, Sweeteners, Honey and Confectionery." In *FOOD PROCESSING AND PRESERVATION*, edited by B. SIVASANKAR, 372. New Delhi: PHI Learning Pvt. Ltd. <http://books.google.com/books?id=fiot7sax0ZEC&pgis=1>.
- Sridharan, Gokul, and Akhil A. Shankar. 2012. "Toluidine Blue: A Review of Its Chemistry and Clinical Utility." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP* 16 (2): 251–55. doi:10.4103/0973-029X.99081.
- Thakur, Abhinav. 2010. "Synthesis of Mesoporous Titania." <http://dc249.4shared.com/doc/fZ4AY94w/preview.html>.
- Timberlake, Karen C. 2007. *Laboratory Manual for General, Organic and Biological Chemistry*. Frist. Benjamin Cummings.
- Universidad de Guadalajara. 2013. "Análisis Coyuntural: Inulina Y Jarabe de Agave Mexicano ." *Inteligencia Competitiva IDITpyme*.
- Valenzuela-Sánchez, Karla K., Raul E. Juárez-Hernández, Andrés Cruz-Hernández, Víctor Olalde-Portugal, María Elena Valverde, and Octavio Paredes-Lopez. 2006. "Plant Regeneration of Agave Tequilana by Indirect Organogenesis." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42 (4): 336–40. doi:10.1079/IVP2006788.
- Villegas-Silva, Pablo A., Tanit Toledano-Thompson, Blondy B Canto-Canché, Alfonso Larqué-Saavedra, and Luis F Barahona-Pérez. 2014. "Hydrolysis of Agave Fourcroydes Lemaire (henequen) Leaf Juice and Fermentation with *Kluyveromyces Marxianus* for Ethanol Production." *BMC Biotechnology* 14 (January): 14. doi:10.1186/1472-6750-14-14.
- Waleckx, Etienne, Anne Gschaedler, Benoît Colonna-Ceccaldi, and Pierre Monsan. 2008. "Hydrolysis of Fructans from Agave Tequilana Weber Var. Azul during the Cooking Step in a Traditional Tequila Elaboration Process." *Food Chemistry* 108 (1): 40–48. doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.028.
- Weber, Walter J. 1979. *Control de La Calidad Del Agua: Procesos Fisicoquímicos*. Reverte. <http://books.google.com/books?id=TLpzh5HQYvgC&pgis=1>.

- Xu, Du-Juan, Quan Xia, Jia-Jia Wang, and Pei-Pei Wang. 2008. "Molecular Weight and Monosaccharide Composition of Astragalus Polysaccharides." *Molecules* 13 (10): 2408–15. doi:10.3390/molecules13102408.
- Yu, Ping, R. James Kirkpatrick, Brent Poe, Paul F. McMillan, and Xiandong Cong. 2004. "Structure of Calcium Silicate Hydrate (C-S-H): Near-, Mid-, and Far-Infrared Spectroscopy." *Journal of the American Ceramic Society* 82 (3): 742–48. doi:10.1111/j.1151-2916.1999.tb01826.x.
- Zittan, L. 1981. "Enzymatic Hydrolysis of Inulin — An Alternative Way to Fructose Production." *Starch - Stärke* 33 (11): 373–77. doi:10.1002/star.19810331105.
- Zuniga Partida, Virgilio, Arturo Camacho Lopez, and Alvaro de Jesus Martinez Gomez. 1998. "METHOD OF PRODUCING FRUCTOSE SYRUP FROM AGAVE PLANTS". United States of America.