

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

En el presente capítulo se consideran los aspectos referentes a la localización del área de estudio, materiales, equipos y reactivos empleados; y, manejo específico del experimento.

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

Ubicación geográfica del Cantón Ibarra.

Los frutos morfotipo local se cosecharon en Hacienda la Delicia del señor José Madera comunidad el Tejar.

País: Ecuador.

Cantón: Ibarra.

Provincia: Imbabura.

Ubicación: 115Km al Noreste de Quito, 125 Km al Sur de Tulcán

Altura: 2225msnm

Clima: Templado Seco

Temperatura: 18°C

Fuente. (Gobierno Municipal de Ibarra 2000).

Ubicación geográfica del Cantón Pimampiro.

Los frutos morfotipo colombiana se cosecharon en la finca del señor Juan Revelo, comunidad de Quinta Yuquín.

País: Ecuador

Provincia: Imbabura
Cantón: Pimampiro
Ubicación: Noreste de Imbabura
Temperatura Media 17°C
Clima: Cálido, Templado y frío
Altitud: 1800msnm a 3400msnm
Fuente. (Gobierno Municipal de Pimampiro 2000).

Ubicación del experimento

Los análisis de las propiedades Físicas y Químicas e la Granadilla se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería en ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte.

3.2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

3.2.1. Material de vidrio

Vasos de precipitación de 200, 250, 500, 100 ml pirex, buretas graduadas de 25, 50, probetas de 25, 50, 100 ml. Pipetas graduadas de 1, 5, 10, ml, erlenmeyers de 200, 250 ml pirex, tubos de ensayo fotocolorimétricos, termómetros graduados 0°C, a 100°C agitadores magnéticos, tubos para centrífuga, picnómetro de 0 a 100 ml. frascos ámbar, balones de aforo, cajas petri, balones Kjendal balones de aforo de 100, 250, 500.

3.2.2. Equipos

Potenciómetro, balanza analítica, balanza de precisión 0.1g, un destilador de agua, centrífuga, estufa eléctrica, mufla, licuadora, macro kjeldahl, soslex, bomba de vacío, viscosímetro, penetrómetro, cocineta, refrigerador, desecador, mechero bunsen refractómetro de ABBE, termómetro incorporado al refractómetro, baño maría.

3.2.3. Reactivos

ácido sulfúrico, ácido metafosfórico, ácido clorhídrico 01 normal, ácido bórico, acetato de plomo, azul de metileno, sacarosa, fenoltaleína, soluciones buffer, licor Fellingh, solución estándar de indofenol, sulfato de cobre, tartrato de sodio, Agua destilada, hidróxido de sodio 0.1 N, acetona, mezcla sulfocrómica.

3.2.4. Varios

Cronómetro, espátula, gradilla, pinzas para bureta, porta embudos, soporte universal, cápsulas de porcelana, tamices, pie de rey, jarros de 250, 500, 1000 ml, utensilios de cocina, papel filtro, tapones, espátulas, kitasato, mortero de porcelana, agitadores magnéticos, pinzas, papel carbón.

3.2.5. Materia prima vegetal

Se utilizaron granadillas que pertenecen a la especie *Passiflora ligularis* J, del morfotipo colombiana proveniente de la Comunidad Quinta Yuquín, cantón Pimampiro, propiedad del Sr. Juan Revelo y el morfotipo local proveniente del Cantón Ibarra Comunidad El Tejar Hacienda La Delicia, propiedad del señor José Madera.

3.2.6. Modelo estadístico

Para la evaluación estadística se utilizó el diseño propuesto por el INEN, de acuerdo siguiente formato:

Cuadro 1. Modelo de presentación de resultados.

MUESTRA	CARACTERÍSTICA ESTUDIADA		
	VERDE	PINTÓN	MADURO
M1			
M2			
M3			
PROMEDIO			
DESVIACIÓN.			

Donde:

M1= Promedio de la repetición 1

Estado de madurez VERDE

M1= Promedio de la repetición 2

Estado de madurez PINTON

M1= Promedio de la repetición 3

Estado de madurez MADURO

3.2.7. Manejo específico del experimento

Tanto para las propiedades físicas como químicas se destinaron las respectivas muestras de frutos, de acuerdo con el siguiente detalle:

Material de estudio (morfotipos)	2
Estados de madurez	3
Repeticiones	3
Tamaño de cada repetición	30
Total mediciones	
Morfotipo colombiana	270
Morfotipo local	270

Para el análisis químico.

Material de estudio (morfotipos)	2
Estados de madurez	3
Repeticiones	3

Muestras	3
Total repeticiones	
Morfotipo colombiana	27
Morfotipo local	27

Se tomaron muestras al azar, se seleccionaron 30 para cada análisis físico, 5 unidades para los análisis químicos, y 20 unidades para el análisis de proteína. El muestreo se realizó tomando en cuenta Norma NTE. INEN 378 y Norma NTC 4101.

3.2.8. Fórmulas utilizadas para el cálculo de límites de confianza

Para pruebas físicas:

$$\text{Límite de confianza} = \text{Promedio} \pm \left(\frac{t_{(n-1)} \times \sigma_p}{\sqrt{n}} \right)$$

Donde:

$t_{(n-1)}$ = Valor al 5% de error en la tabla t de Student.

σ_p = Desviación poblacional.

\sqrt{n} = Número total de repeticiones utilizadas.

Para pruebas químicas:

$$\text{Límite de confianza} = \text{Promedio} \pm \left(\frac{T_{(n-1)} \times \sigma_m}{\sqrt{n}} \right)$$

$t_{(n-1)}$ = Valor al 5% de error en la tabla t de Student.

σ_m = Desviación de la muestra.

\sqrt{n} = Número total de repeticiones utilizadas.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Método para la determinación de las muestras

Se seleccionaron las frutas sanas de tamaño uniforme del color deseado, se procedió a limpiarlas, secarlas, luego cortarlas con un cuchillo filo en forma transversal para poder extraer la parte comestible, con la ayuda de una licuadora a la más baja velocidad se procedió extraer el jugo para luego colarlo y tener un jugo limpio sin residuos de semilla.

3.3.2. Métodos para evaluar las propiedades físicas

Los métodos empleados para la caracterización del fruto en tres grados de madurez, son los establecidos por el INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización) y por AOAC (Association Of Official and Analytical Chemists).

3.3.2.1. Propiedades Físicas

Se utilizaron 90 frutos sanos, los cuales se agruparon en muestras de 30 unidades, se registraron los datos por triplicado por cada estado de madurez. Los frutos fueron cosechados al azar, y seleccionados para las mediciones.

3.3.2.2. Determinación del Tamaño

Se midieron los diámetros, tanto radial (menor) y polar (mayor) empleando un calibrador de tipo pie de rey que nos permite medir hasta la milésima parte del centímetro y el resultado se expresó en cm.

Cálculo para el diámetro polar

$$(\sum dp_1 + dp_2 + dp_3 + dp_4 + \dots + dp_{30}) / 30 = X$$

dp₁, dp₂, dp₃ = diámetro polar de cada fruto

Cálculo para el diámetro polar

$$(\sum dr1 + dr2 + dr3 + dr4 + \dots + m30) / 30 = X$$

dr1, dr2, dr3 = diámetro radial de cada fruto.

3.3.2.3. Determinación de forma.

Por recomendación del INEN se tomó como referencia las figuras geométricas para precisar la forma del fruto, que se realizó visualmente.

3.3.2.4. Determinación del color

El color del fruto de granadilla se determinó tomando como referencia Norma Técnica Colombiana NTC N° 4101.

Se colocó las granadillas en orden desde el verde en orden hasta el amarillo completo observarse la variación del color, separando al fruto en las siguientes categorías.

Color 1: El color verde pierde intensidad y aparecen leves tonalidades amarillas.

Color 2: Aumenta el color amarillo en la zona media del fruto y permanece el color verde en la región cercana al pedúnculo y a la base del fruto.

Color 3: Predomina el color amarillo que se hace más intenso, manteniéndose verde la zona cercana al pedúnculo y a la base.

Color 4: El color amarillo ocupa casi toda la superficie del fruto, excepto pequeñas áreas cercanas al pedúnculo y a la base, en donde se conserva el color verde.

Color 5: El fruto es totalmente amarillo.

Color 6: El fruto presenta coloraciones anaranjadas y tonalidades rojizas.

Según Norma Técnica Colombiana 4101.

3.3.2.5. Determinación del volumen.

Método del volumen ocupado (Norma INEN 394) Se sumergió cada fruta en un recipiente de capacidad de 1000 ml, previamente calibrado con agua destilada hasta 700 ml, se observó la diferencia de altura que alcanza el líquido y por diferencia de alturas se determinó el volumen desalojado.

Cálculo.

$$V1 - V2 = Vf$$

Dónde:

V1 = Volumen de aforo a 700 ml

V2 = Volumen del agua + la fruta sumergida.

Vf = Volumen desplazado por la fruta.

3.3.2.6. Determinación de peso bruto.

Método de diferencia de pesos, se utilizó una balanza con capacidad de 1000g a 0,1g y se pesó uno a uno, se registraron 30 datos, por tres repeticiones, es decir que se midieron 90 frutos por cada estado de madurez y por cada morfotipo.

Cálculo Para el promedio:

$$(\sum p1 + p2 + p3 + p4 + \dots + p30) / 30 = X$$

Donde:

P1, P2, P3 = Pesos registrados de cada una de las muestras.

30 = El número de muestras registradas.

X = Promedio de los pesos registrados.

3.3.2.7. Determinación del porcentaje de cáscara, jugo y semilla.

Método de diferencia de pesos. Con un cuchillo se procedió a cortar la fruta en dos mitades y se separó la cáscara, se pesó en la balanza, se registraron uno a uno los pesos por 30 veces para así obtener el peso promedio tanto de la cáscara como del jugo.

Cálculo del peso de la cáscara

$$1.- P_t - P_{js} = P_c$$

Donde:

P_c = peso de la cáscara.

P_t = peso total del fruto.

P_{js} = peso del jugo + la semilla.

Cálculo del peso del jugo

$$P_j = P_{js} - P_s \quad \text{o} \quad P_s = P_{js} - P_j$$

P_j = peso del jugo.

Cálculo del peso de la semilla

P_{js} = peso del jugo + la semilla.

P_s = peso de la semilla.

Se consideró el peso total del fruto como el 100 % y se calculo los porcentajes de cáscara, semilla y jugo; mediante la aplicación de la regla de tres simple.

3.3.2.8. Determinación de densidad del fruto.

Método de densidad relativa (INEN 391) Para fruto entero, la densidad se determinó mediante la relación de masa y volumen. Al fruto entero se le sumergió en un litro de agua y se midió el volumen desplazado.

Cálculo:

$$d = m/v$$

Dónde:

m = peso del fruto

v = volumen desplazado.

3.3.2.9. Determinación de firmeza del fruto.

Método del penetrómetro, utilizando el penetrómetro se procedió a encerar para luego con una ligera presión sobre el fruto, hasta observar la lectura en el indicador análogo; se registraron y se continuó con el procedimiento estadístico.

El índice de penetración (firmeza) Viene expresado en Dinas, en K/cm^2 . Una DINA es igual a $g \times cm / seg^2$.

Cálculo:

$$(\sum f_1 + f_2 + f_3 + f_4 + \dots + f_{30}) / 30 = X$$

Donde:

f_1, f_2, f_3 = fuerza registrada de cada una de las muestras.

30 = el número de muestras registradas.

X = promedio de los pesos registrados.

3.3.2.10. Determinación del índice de refracción.

Método refractométrico, mediante la utilización del refractómetro de ABBE, con regulador de temperatura, con escala graduada para el índice de refracción en milésimas, Se procedió a calibrar de tal manera que a $20^\circ C$ se registre un índice de refracción de 1,3330 para el agua destilada.

Se tomó la muestra del jugo de gradilla, se colocó en el refractómetro se observó y registró los datos del índice de refracción y grados Brix.

Cálculo:

$$N_D^{20} = N_D^t + 0,00013(t-20)$$

Donde:

N_D^{20} = Índice de refracción a 20°C

N_D^t = Índice de refracción a la temperatura a la que se efectuó el ensayo.

T = Temperatura a la que se realizó el ensayo (en grados C).

3.3.3. MÉTODOS PARA EVALUAR LAS PROPIEDADES QUÍMICAS.**3.3.3.1. Determinación de acidez.**

Método de acidez titulable (INEN 381). El procedimiento se realizó de la siguiente manera: en un vaso de precipitado de 50 ml, se midió 10 ml de jugo, se agregó 10 ml de agua destilada, seguido de unas gotas de fenoltaleína, se procedió a titular la muestra con NaOH (0,1166,- 0.102N) de factor conocido hasta cambio de color se registró la cantidad de NaOH consumido; se expresa como en porcentaje de ácido cítrico.

Cálculo.

$$A = (V1 * N1 * M) / V2$$

Donde:

A = gramos de ácido en 1000 cc de producto.

V1 = cm³ de NaOH usados para la titulación de la alícuota.

N1 = normalidad de la solución de NaOH.

M = peso molecular del ácido cítrico.

V2 = Volumen de la muestra.

3.3.3.2. Determinación del pH.

Método potenciométrico norma técnica ecuatoriana INEN 389. Para la medición del pH se procedió a encerrar el potenciómetro, en un vaso de precipitación colocar 10 ml de jugo de granadilla se agitó y se colocó en potenciómetro cuidadosamente se introdujo en el jugo los electrodos, se observó la lectura y se registraron los datos uno a uno.

3.3.3.3. Determinación de humedad y sólidos totales.

Método de secado en estufa y cápsula abierta. Para la determinación de la humedad y sólidos totales se emplearon 9 cápsulas de porcelana por lo que procedió a lavarlas secarlas en una estufa calentada a la temperatura de $105^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos; se paso a un desecador, para enfriar durante 45 – 60 minutos y se taró.

En estas cápsulas se añadieron 10 ml de jugo de granadilla, Se las colocaron en la estufa a una temperatura de 105°C durante 48 horas, hasta que estuvieron secas se sacaron de la estufa y colocó en el desecador para enfriar y nuevamente se procedió a secar en la estufa por 2 horas, se sacaron y se pesó, se volvieron a secar y pesar hasta que se obtuvo el peso constante.

Cálculo de la materia Seca

$$E = 100[(m_2 - m)/(m_1 - m)]$$

Donde:

- E = materia seca %
- m = masa de la cápsula con el papel filtro g
- m₁ = masa de la cápsula con el papel filtro y la muestra antes del secado
- m₂ = masa de la cápsula con el papel filtro y la muestra después del secado g

Cálculo:

$$H = (100 - E)$$

Siendo:

$$H = \text{humedad}$$

$$E = \text{materia seca \%}$$

3.3.3.4. Determinación de ceniza.

Método de mufla en capsula abierta (AOAC). A la muestra seca obtenida de la humedad se procedió a secarla en la mufla durante 48 horas a temperatura de 550°C, en este caso fue difícil quemar todo el carbono del alimento por lo que en el fondo del crisol aparecieron pequeñas partículas negras por lo que procedí a colocar unas gotas de alcohol, se dejo en la estufa hasta que se seque, luego se pasó a la mufla, aún había presencia de partículas negras, coloqué HNO₃, deje secar en la estufa a 105°C, al siguiente día se colocó en la mufla, una vez completamente secos procedía a pesar, secar hasta obtener peso constante. Registré uno a uno los datos.

Cálculo.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(\text{peso del crisol} + \text{residuo}) - (\text{peso del crisol} + \text{muestra})}{\text{g muestra}} \times 100$$

3.3.3.5. Determinación de sólidos solubles.

Mediante el método refractométrico, la determinación de los sólidos solubles se tomo como referencia la Norma INEN 380, utilizando de refractómetro de ABBE con una escala de 0 a 90 °Brix.

Una vez encerado el refractómetro se procedió de la siguiente manera: se colocó una gota del jugo en el prisma, se tapo cuidadosamente y se observó la lectura a través del lente, se registraron los datos uno a uno.

3.3.3.6. Determinación de sólidos en suspensión.

Método de sedimentación por centrifuga (INEN 388), se determinó el contenido de sólidos en suspensión.

En los tubos cónicos se colocó 5cm³ de muestra, se procedió a centrifugar y se observaron los centímetros de sólidos que se suspendieron, debido a la fuerza centrífuga.

Cálculo.

$$S = (2 \cdot V)$$

Siendo:

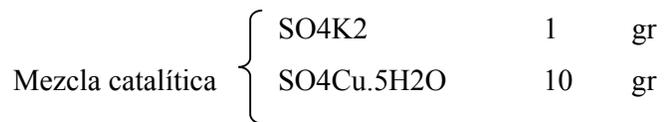
S = Contenido de sólidos en suspensión porcentaje de volumen

V = Volumen de la capa sedimentada. cm³

3.3.3.7. Determinación de proteína.

Método Kjendhal de AOAC. Para poder determinar las proteínas del jugo de granadilla fue necesario deshidratar el jugo, y moler finamente en un crisol de porcelana, se pesaron 10gramos de muestra seca, y se colocó en un balón de aforo, acto seguido se midió 80ml de ácido sulfúrico concentrado y se colocó cuidadosamente en el balón para quemar la muestra, luego de pesó y se agregó la mezcla catalítica para acelerar la reacción, también se añadió cuidadosamente agua destilada y procedió a colocar el balón en el equipo de Kjendhal para la digestión durante 36 horas, una vez que se ha completado la digestión se procedió a la destilación del amoniaco y se concluyo con la valoración. El indicador de proteína rojo de metilo más azul de metileno.

Se prepara la muestra catalítica la misma que acelera la reacción.



SO₄H₂ 80 ml

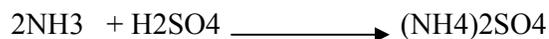
MUESTRA 10 10g

SO₄K₂ (1g) + CuSO₄·5H₂O (10gr)

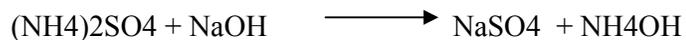
Este procedimiento se divide en tres etapas:

1.- Mineralización del nitrógeno orgánico.

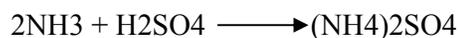
REACCIONES.



2.- Etapa destilación del amoníaco.



3.- Etapa de valoración y cálculo.



Cálculo

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{Ve} \times \text{N} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4) \times \text{meq-g N} \times 100}{\text{p}}$$

$$\% \text{ P} = \% \text{ N} \times 6,25.$$

Donde:

%N = Porcentaje de nitrógeno

Ve = Volumen de SO₄H₂ consumido de normalidad conocida.

N.H₂SO₄ = Normalidad del ácido sulfúrico conocido.

meq-g N =Mili equivalente gramo del nitrógeno.
 P = gramos de muestra.
 %P = Porcentaje de proteína.

Nota: El valor de la proteína bruta se calculó a partir del nitrógeno total, utilizando el factor apropiado o general.

Factores específicos para el cálculo de proteína.

PRODUCTO	FACTOR.
LACTEOS	6,38
CEREALES	5,70
ARROZ	5,95
GELATINA	5,55
GENERAL	6,25

Osborne. 1981.

3.3.3.8. Determinación de azúcares reductores libres.

Método de fehling. Estandarización y cálculo del factor “f” de la solución de Fehling.

El factor utilizado es = 0.57, volumen empleado 500 ml, se procedió a registrar los pesos tanto del vaso, como los 25 ml de muestra, se aforó con agua hasta obtener un volumen de 100 ml, se agregó 5 ml de acetato de plomo para formar un precipitado de color blanco, se procedió a filtrar cuidadosamente con la ayuda de una bomba de vacío. Este filtrado se aforó en un balón hasta 500 ml con agua destilada. Por lo que con esta solución procedí a colocar en la bureta para titular el Fehling hasta cambio de color.

En un vaso de precipitación se colocó 5ml de fehling A y fehling B Más 40 ml de agua destilada, poner a hervir colocando 2 gotas de azul de metileno y se registraron los valores observados de la titulación.

Cálculo de los azúcares reductores libres.

$$\% \text{ A.R.} = \frac{V_1 \times f}{V_2 \times P} \times 100$$

Donde:

V_1 = Volumen del balón utilizado (100, 250 500 ml)

f = Factor de la solución de Fehling C.

V_2 = Volumen de solución de azúcar reductor gastado de la bureta.

P = Peso de muestra utilizado.

Relación: Glucosa/Azúcar:

$$\text{GLUCOSA} = \frac{3.333 \times \% \text{ A.R.}}{^\circ \text{ Brix}} \times 100$$

Azúcar = 100 – Glucosa.

3.3.3.9. Determinación de azúcares reductores totales.

Método de Luf Schore, Se pesó 10 g de jugo, se trasvasó a un balón y se agregó unos 50 ml de agua destilada, 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se conectó a un refrigerante para someter a reflujo por 1 hora, se trasvasó el contenido a un vaso de precipitación de 500 ml, se procedió a lavar el contenido del balón y pasar, evitando pérdidas al vaso, se neutralizó con solución de NaOH al 30 % hasta pH = 7. Se procedió de la misma manera de la determinación de azúcares reductores libres.

Cálculo:

$$\% \text{ A.R.} = \frac{V_1 \times f}{V_2 \times P} \times 100$$

Donde:

V_1 = Volumen del balón utilizado (100, 250 500 ml)

f = Factor de la solución de Fehling C.

V_2 = Volumen de solución de azúcar reductor gastado de la bureta.

P = Peso de muestra utilizado.

3.3.3.10. Determinación de fibra.

Método de digestión ácido-base AOAC. Se procedió a pesar 20g de jugo de granadilla y se siguieron los pasos del método de la digestión Ácida, la temperatura de la estufa es de 105°C, la temperatura de la estufa es de 550°C.

Cálculo:

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{(m1 - m1c) - m2}{\text{g muestra}} \times 100$$

Donde:

m1 = masa del residuo + papel luego de secado a 103 °C.

m1c = masa del papel seco en g (luego de haber tratado con mezcla ácida).

m2 = masa del residuo luego de la calcinación.

3.3.3.11. Determinación de densidad del jugo.

Método de densidad relativa (INEN 391) La masa del líquido se determinó por diferencia entre la masa del picnómetro lleno y vacío, por tanto la densidad del líquido es el cociente entre su masa y el volumen que ocupa.

Cálculo

$$\delta = (m3 - m1) / (m2 - m1)$$

Dónde:

δ = densidad relativa

m1 = masa del picnómetro vacío (g)

m2 = masa del picnómetro con agua (g)

m3 = masa del picnómetro con la muestra (g)

3.3.3.12. Determinación de viscosidad del jugo.

Método IANCEM. Gracias que en el Ingenio Azucarero IANCEM me facilitaron la utilización del viscosímetro, se procedió a realizar los análisis de las muestras de la siguiente manera; En un vaso de precipitación se colocaron 500ml de muestra, se homogenizó la muestra y se colocó en el viscosímetro, tomando en consideración la consistencia del líquido se definió el número de espín, en este caso es el N° 1, se procedió a calibrar con las revoluciones igual a 12 rpm, el tiempo para cada muestra de 30 segundos, se midió la temperatura del líquido y se procedió a encender el viscosímetro, registrando a continuación las lecturas. El factor calculado es 5 y se multiplicó por la lectura observada, obteniendo de esta manera el valor de la viscosidad del jugo.

Cálculo.

Valor de la lectura el viscosímetro por 5 el factor de conversión, tomado en consideración parámetros de tiempo programado, N° de revoluciones programadas, el número de spín empleado. Nos dio un factor de conversión = 5.

3.3.3.13. Determinación de vitamina C

Método de titulación con 2,6 – diclorofenolindofenol

Se procedió a pesar 5g de muestra, se agregaron 10 ml de solución de extracción y se sometió a agitación constante por 25 minutos. Se dejó en reposo hasta que se observó un precipitado, con la ayuda de una bomba de vacío se filtró en un balón de 50 ml, nuevamente se agregó 10 ml de solución de extracción se agitó por 10 minutos, se repitió la operación por 4 veces hasta completar 50 ml del balón.

A continuación se cogieron alícuotas de 10 ml del balón, se procedió a titular con la solución de diclorofenolindofenol hasta aparición de color rozado persistente por 5 segundos.

Cálculo:

Mg /g de vitamina C:

$$\text{Mg ácido ascórbico de la solución} = (X - B)(F/E)(V/Y)$$

Donde:

X = Promedio de ml de Diclorofeno – indofenol gastados en la muestra.

B = Promedio de ml de Diclorofeno – indofenol gastados en el blanco.

F.= mg de ácido ascórbico equivalente a 1,0 ml de solución estándar de diclorofeno – indofenol

E = peso de la muestra.

V = Volumen aforado.

Y = Alícuota titulada.

3.3.3.14. Determinación vitamina B.

Se envió las muestras al Laboratorio de la Universidad Central del Ecuador, en donde utilizaron el método HPLC.

3.3.3.15. Determinación del calcio.

Se envió las muestras al Laboratorio de la Universidad Central del Ecuador, en donde utilizaron el método volumétrico.

3.3.3.16. Determinación del fósforo.

Se envió las muestras al Laboratorio de la Universidad Central del Ecuador, en donde utilizaron el método HPLC.

3.3.3.17. Determinación del hierro.

Se envió las muestras al Laboratorio de la Universidad Central del Ecuador, en donde utilizaron el método del espectrofotómetro.