

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La verificación de la calidad de la extracción de las vainas puede realizarse de acuerdo a lo planteado en la sección “3.2 características de la materia prima”, ya que la verificación de la calidad debe llevarse a cabo desde la recepción de la materia prima de acuerdo a la determinación de la humedad, como se estableció realizar variaciones dentro del proceso de extracción se determinó la calidad del proceso mediante la cuantificación de vainillina y cuantificación de color mediante la implementación de un diseño factorial 2^k .

6.1 Diseños factoriales 2^k

En el estudio sobre la mejora de procesos industriales es usual trabajar en problemas en los que hay muchos factores que pueden influir en la variable de interés. La utilización de experimentos completos en estos problemas tiene el gran inconveniente de necesitar un número elevado de observaciones, además puede ser una estrategia ineficaz porque muchos de los factores en estudio no son influyentes y mucha información recogida no es relevante. En este caso una estrategia mejor es utilizar una técnica secuencial donde se comienza por trabajar con unos pocos factores y según los resultados que se obtienen se eligen los factores a estudiar en la segunda etapa.

El diseño factorial 2^k es un proyecto con el que se puede trabajar con k factores, todos ellos con dos niveles (se suelen denotar + y -). Estos diseños son adecuados para tratar el tipo de problema planteado en esta tesis, además de permitir trabajar con un número elevado de factores y estrategias secuenciales.

6.1.1 Planificación de un experimento

La experimentación forma parte natural de la mayoría de las investigaciones científicas e industriales, en muchas de las cuales, los resultados del proceso de interés se ven afectados por la presencia de distintos factores, cuya influencia puede estar oculta por la variabilidad de los resultados. Es fundamental conocer los factores que influyen realmente y estimar esta influencia. Para conseguir esto es necesario experimentar, variar las condiciones que

afectan a las unidades experimentales y observar la variable respuesta. Del análisis y estudio de la información recogida se obtienen las conclusiones.

La forma tradicional que se utilizaba en la experimentación, para el estudio de estos problemas, se basaba en estudiar los factores uno a uno y variar los niveles de un factor permaneciendo fijos los demás (Vilar, 2006). Esta metodología presenta grandes inconvenientes:

- Es necesario un gran número de pruebas.
- Las conclusiones obtenidas en el estudio de cada factor tiene un campo de validez muy restringido.
- No es posible estudiar la existencia de interacción entre los factores.
- Es inviable por problemas de tiempo o costo.

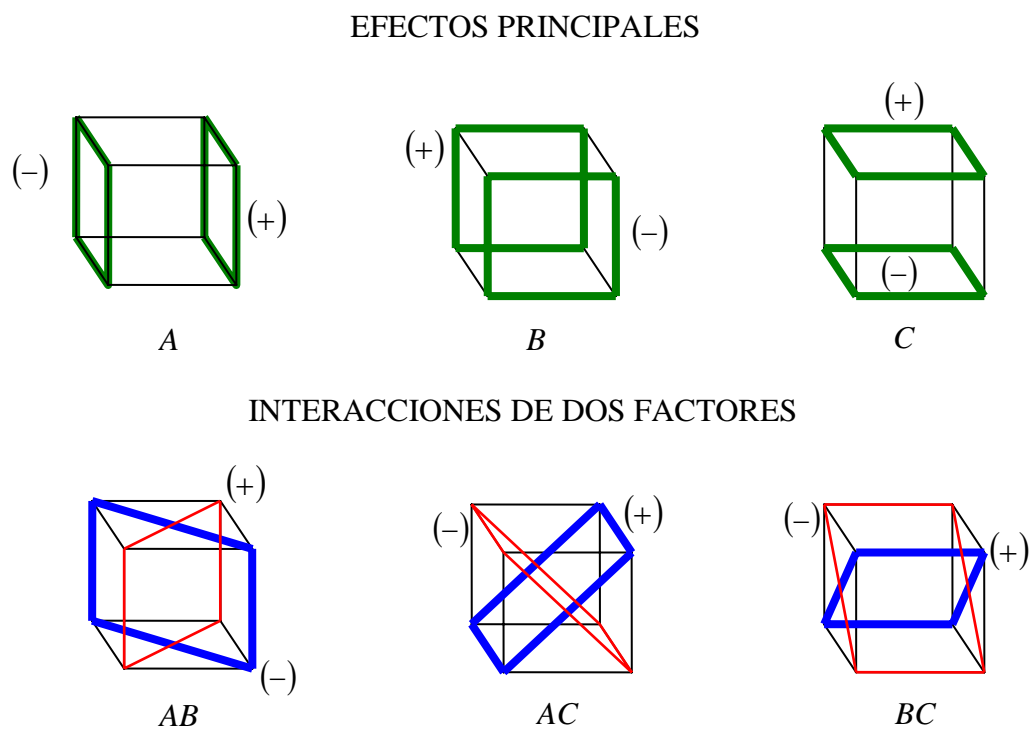
Las técnicas de diseño de experimentos se basan en estudiar simultáneamente los efectos de todos los factores de interés, son más eficaces y proporcionan mejores resultados con un menor costo (Vilar, 2006).

6.1.2 Etapas del diseño de un experimento factorial 2^k

A continuación se enumeran las etapas que deben seguirse para una correcta planificación de un diseño experimental, etapas que deben ser ejecutadas de forma secuencial (Vilar, 2006). Las etapas a seguir en el desarrollo de un diseño de experimentos son las siguientes:

- 1 Definir los objetivos del experimento.
- 2 Elegir una regla de asignación de las unidades experimentales a las condiciones de estudio (tratamientos).
- 3 Especificar las medidas con que se trabajará (la respuesta), el procedimiento experimental y anticiparse a las posibles dificultades.
- 4 Ejecutar un experimento piloto.
- 5 Especificar el modelo.
- 6 Esquematizar los pasos del análisis.
- 7 Determinar el tamaño de la muestra.

Los pasos del listado anterior no son independientes y en un determinado momento puede ser necesario volver atrás y modificar decisiones tomadas en algún paso previo. Para poder ejemplificar el contenido del diseño factorial 2^k utilizado se presentan las figuras 9 y 10.



La matriz del diseño

- A* : Recirculaciones
- B* : Origen
- C* : Solvente

Figura 9. Representación grafica efectos principales e interacciones de los factores.

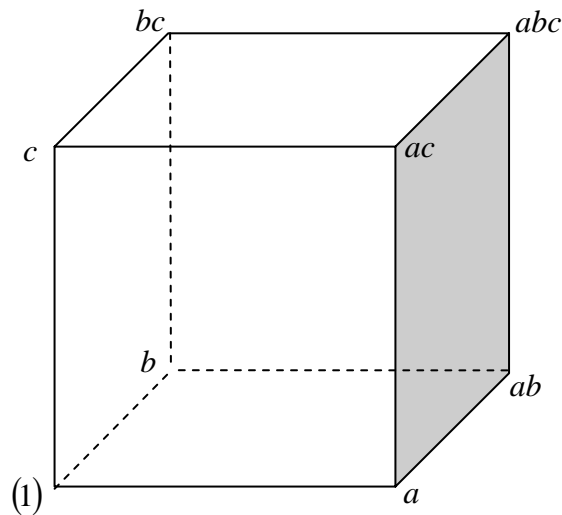


Figura 10. Interacción de los tres factores principales y sus dos niveles.

6.2 Determinación del contenido de humedad por destilación con disolventes

6.2.1 Reactivos

Solución de tolueno 80 % (v/v) - benceno 20 % (v/v)

6.2.2 Aparatos e instrumentos

- Matraz de bola con cuello corto de 500 ml, con uniones de 24/40.
- Trampa de Widwell-Sterling, con boca de 24/40 (trampa colectora).
- Refrigerante de West, de 400 mm. de longitud, con unión macho de 24/40.
- Estufa eléctrica con agitación magnética.
- Agitador magnético.

6.2.3 Preparación de la muestra

Se cortan las vainas de vainilla en fracciones de no más de 0,65 cm. de longitud, cuidando no alterar el contenido en agua de la vaina.

6.2.4 Procedimiento

- Determinar la masa de 10 g a 40 g de vainilla en fracciones (véase 7.2.1 de la norma mexicana NMX-FF-074-1996) y transferir al matraz de destilación.
- Adicionar aproximadamente de 75 ml a 100 ml de solución de tolueno - benceno, de manera que la muestra quede cubierta por completo, introducir el agitador magnético en el fondo del matraz y conectar la trampa colectora, así como el refrigerante, esto se puede analizar en la figura 11.
- Colocar este dispositivo sobre la estufa eléctrica, iniciar la agitación magnética y calentar la solución del matraz hasta ebullición.
- Destilar a una velocidad de una a dos gotas por segundo hasta que se haya recogido en la trampa la mayor parte de agua; entonces aumentar la velocidad de destilación a unas cuatro gotas por segundo.
- Cuando aparentemente se haya eliminado toda el agua (se manifiesta por la aparición de una capa clara de tolueno-benceno en la parte superior de la trampa), se lava el refrigerante vertiendo la mezcla de tolueno - benceno por su extremo superior, de esta forma las pequeñas gotas de agua que quedan adheridas al refrigerante son arrastradas.
- Se continúa con la destilación durante 5 min., posteriormente se deja enfriar la trampa a temperatura ambiente y se lee el volumen de agua con una precisión de 0,01 ml.

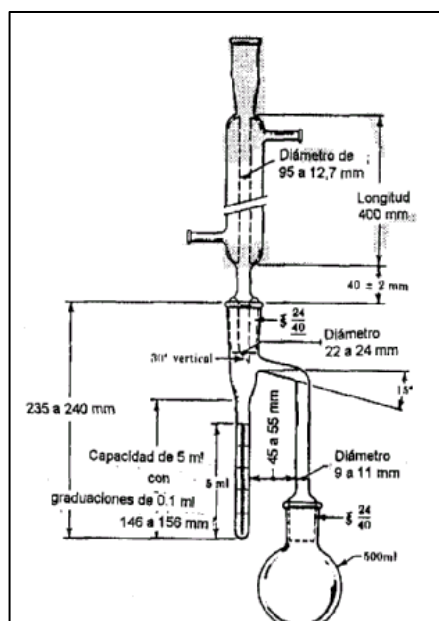


Figura 11. Aparato para la determinación del porcentaje de humedad.

6.3 Determinación de vainillina

6.3.1 Reactivos

Solución de hidróxido de sodio 1M.

6.3.2 Aparatos e instrumentos

- Dos celdas de cuarzo para el espectrofotómetro UV.
- Etanol (para la limpieza de las celdas, antes y después de su uso).
- Pañuelos desechables

6.3.3 Preparación de la muestra

No se requiere una preparación previa de la muestra para la determinación de la muestra, solo se recomienda una agitación previa a verter el extracto en las celdas.

6.3.4 Procedimiento

- Determinación de la absorbancia específica de vainilla.
- Preparación de la muestra.

6.3.5 Determinación de la absorbancia específica de vainillina

6.3.5.1 Preparación de la solución estándar

En un vaso de precipitados de 25 mL se peso alrededor de 30 mg de vainillina previamente secada en un desecador. Posteriormente se disuelve en 20 mL de etanol que se transfieren a un matraz volumétrico de 250 mL, es muy importante que se realicen varios lavados al vaso de precipitados de 25 mL con etanol y depositarlos en el matraz volumétrico, así se obtiene la solución A1.

Se toma una alícuota de 25 mL de la solución A1 y colocarla en un matraz volumétrico de 200 mL se diluye con etanol y se mezcla, así se obtiene la solución B1.

Se toma una alícuota de 10 mL de la solución B1 y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, agregar aproximadamente 60 mL de etanol y 2 mL de hidróxido de sodio 1M mezclando adecuadamente. Aforar y mezclar para así obtener la solución C1.

6.3.5.2 Preparación de la solución de referencia

En un matraz aforado de 100 mL depositar 2 mL de hidróxido de sodio, aforar y mezclar.

6.3.5.3 Determinación de la absorbancia de la vainillina

Utilizando un Espectrofotómetro UV/Visible se realizó una corrida de la solución de referencia o blanco y la solución estándar que contiene una cantidad de vainillina conocida. Se debe de obtener un grafico similar al presentado en la figura 12.

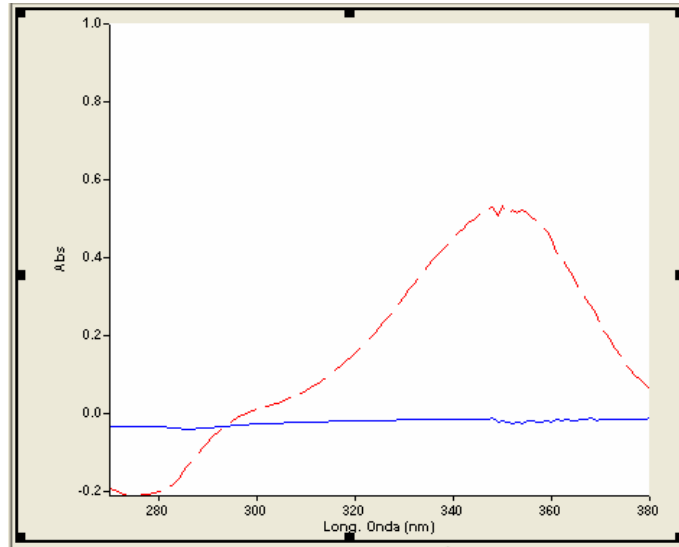


Figura 12. Curva de la solución estándar y de la solución de referencia.

6.3.5.4 Cálculos

La máxima absorbancia debe de ocurrir en una longitud de onda de 350 ± 3 nm. y esa absorbancia debe de encontrarse entre 0.2 y 0.8. La línea base de presentarse en un intervalo de 250 a 420 nm. Es importante recordar que las celdas de cuarzo son las indicadas a utilizar y no celdas de otro tipo de material.

Se calculó la absorbancia específica de vainillina ($E_{1\%}^{1cm}$) mediante la ecuación 1.

$$E_{1\%}^{1cm} = \frac{100(A_{\max} - A_{base})}{m} \quad (1)$$

Donde:

A_{\max} = Absorbancia máxima

A_{base} = Absorbancia en la línea de referencia

m = masa en miligramos de vainillina

6.3.6 Preparación de la muestra

6.3.6.1 Extracción

Pesar 5 gramos de vainas de vainilla y colocar en el interior de un dedal de celulosa desechable, este se colocó dentro de la cámara Soxhlet. En un matraz de bola de dos entradas 24/40 con fondo plano de 500 mL, en este se depositó el solvente a utilizar. Este sistema se mantuvo a una temperatura de ebullición del solvente durante un período de 8 horas.

En la parte superior de la cámara Soxhlet se colocó un refrigerante previamente conectado a un recirculador con el cual se reguló la temperatura mediante la recirculación de agua fría y de esta manera se evitó cualquier escape de los componentes con punto de ebullición más bajo.

Es muy importante mencionar que se debe tener la precaución de sellar con parafilm todas las uniones del dispositivo armado que se presenta en la figura 13.

El extracto obtenido se deposita en un matraz volumétrico de 250 mL realizando varios lavados al matraz de bola y se afora con etanol, así se obtiene la solución A2.

El Soxhlet funciona de manera cíclica para extraer las concentraciones necesarias de algún determinado compuesto, este trabaja de la siguiente forma; se evapora el solvente contenido en un matraz que sube hasta el área donde es condensado para poder descender hacia el compartimiento donde se sitúa el material sólido del cual se extrae el compuesto de interés, durante el tiempo necesario para poder realizar el reflujo del solvente por diferencia de presión y de esta manera separar los compuestos hasta que se llega a una concentración deseada. La representación de este dispositivo se puede observar en la figura 13.



Figura 13. Dispositivo Soxhlet.

6.3.6.2 Determinación del porcentaje de vainillina

Tomar una alícuota de 25 mL y colocar en un matraz aforado de 100 mL se afora y se mezcla, así se obtiene la solución B2.

Se toma una alícuota de 20 mL de la solución B2 en un matraz aforado de 100 mL se afora y se mezcla, así se obtiene la solución C2.

Por último se tomo una alícuota de 10 mL de la solución C2 y se coloco en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregaron 60 mL aproximadamente de etanol y 2 mL de hidróxido de sodio, así se obtuvo la solución D2.

Las lecturas de la solución se llevaron acabo en una longitud de onda de 250 a 420 nm. Utilizando un Espectrofotómetro UV/Visible como el que se muestra en la figura 14.



Figura 14. Espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 Conc.

6.3.6.3 Manera de expresar los resultados.

El contenido de vainillina (w_v), se expresa como porcentaje mediante el uso de la ecuación 2.

$$w_v = \frac{50,000(A_{\max} - A_{base})}{(E_{1\%}^{1cm})(m)} \quad (2)$$

Donde:

m = es la masa en gramos de vainas

6.4 Maceración del extracto (Acondicionamiento)

El proceso de acondicionamiento consistió en almacenar las vainas y el solvente utilizado en la extracción a temperatura ambiente en un compartimiento oscuro para facilitar que la liberación de vainillina continué, estas condiciones son de acuerdo a la referencias consultadas. Los depósitos en los que se llevo acabo este proceso son de frascos de 250 mL de capacidad como el que se muestra en la figura 15.



Figura 15. Frasco utilizado en el proceso e maceración.

6.5 Determinación de color

La determinación de color se llevo acabo siguiendo los pasos establecidos a continuación:

- Conectar el dispositivo de transmitancia.
- Encender colorímetro.
- Dejar cargar el programa, hasta que el dispositivo solicite que la programación a utilizar. Se necesita presionar “Shift + CAL (SET UP)”.
- Presionar “retun”.
- Seleccionar el método de “Transmitancia” (opción uno).
- Presionar “retun”, hasta que aparezca la opción de calibración.
- Seleccionar la opción manual (opción cero).
- Presionar “retun”, hasta que aparezca la orden “Cal zero” la cual debe de llevarse acabo al realizar una corrida al mosaico negro. Es muy importante que se revise que los valores para cada parámetro que aparecen en la pantalla del dispositivo concuerden con los valores que se encuentran en la parte posterior del mosaico utilizado para la calibración del nivel inferior de luminosidad.
- Presionar Cal.
- Aparece la leyenda “Cal full Scale”, la cual indica que se debe de calibrar el nivel alto de la escala de color mediante una lectura con tan solo el paso de luz del dispositivo de transmitancia.
- Presionar la tecla “Cal”
- El dispositivo se encuentra disponible para poder ser utilizado para el análisis debido a que este se encuentra correctamente calibrado.

6.6 Evaluación sensorial de un producto característico

Posterior al acondicionamiento del extracto se realizo la evaluación sensorial mediante la prueba de escala hedónica a veinticinco jueces no entrenados, el producto fue seleccionado por ser comercialmente aceptado en su presentación con sabor a vainilla y así poder realizar una prueba más objetiva al evaluar el aroma y sabor del extracto natural de vainilla.

6.6.1 Preparación de una natilla sabor vainilla

La elaboración de la natilla sabor vainilla con la cual se llevo acabo el análisis de los parámetros de sabor y aroma, se elaboro bajo las instrucciones establecidas en el empaque de la fécula de maíz marca maicena, como se establece de la siguiente manera:

- Se elaboro 1.2 kilogramo de natilla utilizando 1200 mililitros de leche entera marca alpura.
- Se utilizo 20 mililitros de extracto de vainilla para cada una de las tres formulaciones de 400 mililitros, correspondiente a cada uno de los extractos seleccionados como de mejor calidad según la cantidad de vainillina cuantificada en el proceso de acondicionamiento.
- La determinación de color y dulzura se realizo de forma subjetiva, tratando de igualar las condiciones de un producto comercial.

Los pasos fueron los siguientes.

1. Se hierve alrededor de 1 litro de leche a fuego lento.
2. Con la leche restante se disuelve 15 cucharadas soperas de maizena, es importante que la leche se encuentre fría.
3. Posteriormente se adiciona la leche con la maizena disuelta en la leche hirviendo.
4. Se mantiene la agitación durante aproximadamente 5 minutos y se retira del fuego.
5. Ya tibia la leche se adiciona aproximadamente un 3 % de azúcar con respecto a 1.2 kilogramos de natilla.
6. De igual manera se adiciona el colorante comercial marca Mc Cormick, aproximadamente 9 gotas para el total de natilla.
7. Por ultimo se termina de enfriar la natilla para poner a refrigeración durante 8 horas.

Obtenida la formulación base de la natilla solo resta adicionar el saborizante respectivo de cada formulación establecida para la evaluación sensorial, esta información se establece en la tabla 12.

6.6.2 Evaluación sensorial de la natilla

La evaluación sensorial se llevo acabo teniendo los cuidados siguientes para proporcionar las condiciones adecuadas del producto analizado.

- Se licuo la formulación base de la natilla para proporcionar una consistencia cremosa y suave, evitando la presencia de grumos en la natilla.
- Antes de la prueba sensorial se refrigero a aproximadamente 5 ° C, con el objetivo de igualar las condiciones de consumo de este producto.

El formato con el cual se realizó la prueba sensorial se muestra en la figura 16.

Producto <u>EXTRACTO DE VAINILLA</u>		FECHA _____					
Prueba de nivel de agrado, escala estructurada							
Por favor pruebe las muestras e indique su nivel de agrado (<u>marcando con el código de cada muestra</u>) en la escala que mejor describe su reacción para cada uno de los atributos.							
CARACTERISTICA	OLOR			SABOR			
	68042	67101	83174	68042	67101	83174	
Me gusta muchísimo							
Me gusta mucho							
Me gusta moderadamente							
Me gusta poco							
Ni me gusta ni me disgusta							
Me disgusta poco							
Me disgusta moderadamente							
Me disgusta mucho							
Me disgusta muchísimo							
Comentarios: _____							

Gracias por su colaboración							

Figura 16. Formato de evaluación sensorial.

Posterior a la evaluación sensorial se realizo un análisis estadístico de las respuestas obtenidas mediante el programa Minitab 14 para determinar si existe o no diferencia en las tres formulaciones realizadas con respecto a los parámetros de sabor y aroma.

6.6.3 Análisis de resultados de la evaluación sensorial

El análisis de los resultados se llevo a cabo mediante el uso del programa Minitab 14, mediante los siguientes pasos.

- Vaciado de datos de la evaluación sensorial en el programa Minitab 14 como se muestra en la figura 17, en la columna “C1” o “Clave” del programa estadístico se introducen los datos en forma de lista cada clave de los sistemas realizados con sus respectivas respuestas.

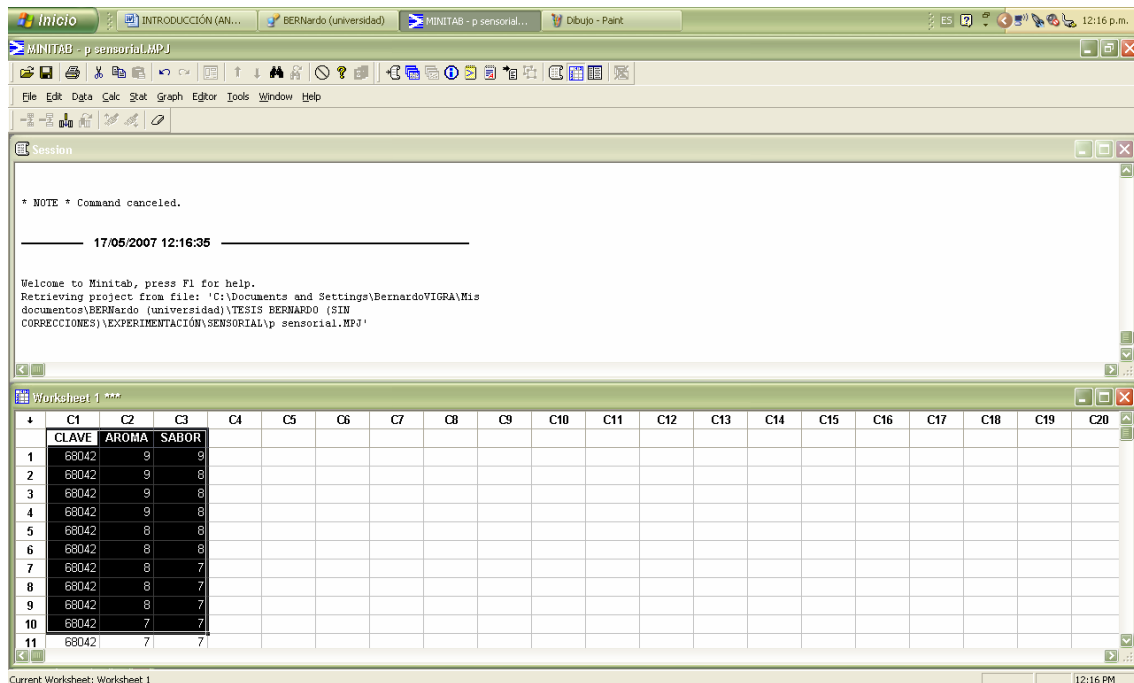


Figura 17. Paso de introducción de datos de del proceso de la evaluación sensorial.

- Selección del método de mediante el cual se realizara el análisis de las respuestas, esto se muestra en la figura 18. La ruta de acceso a seguir es la siguiente: menú Stat – ANOVA – One Way.

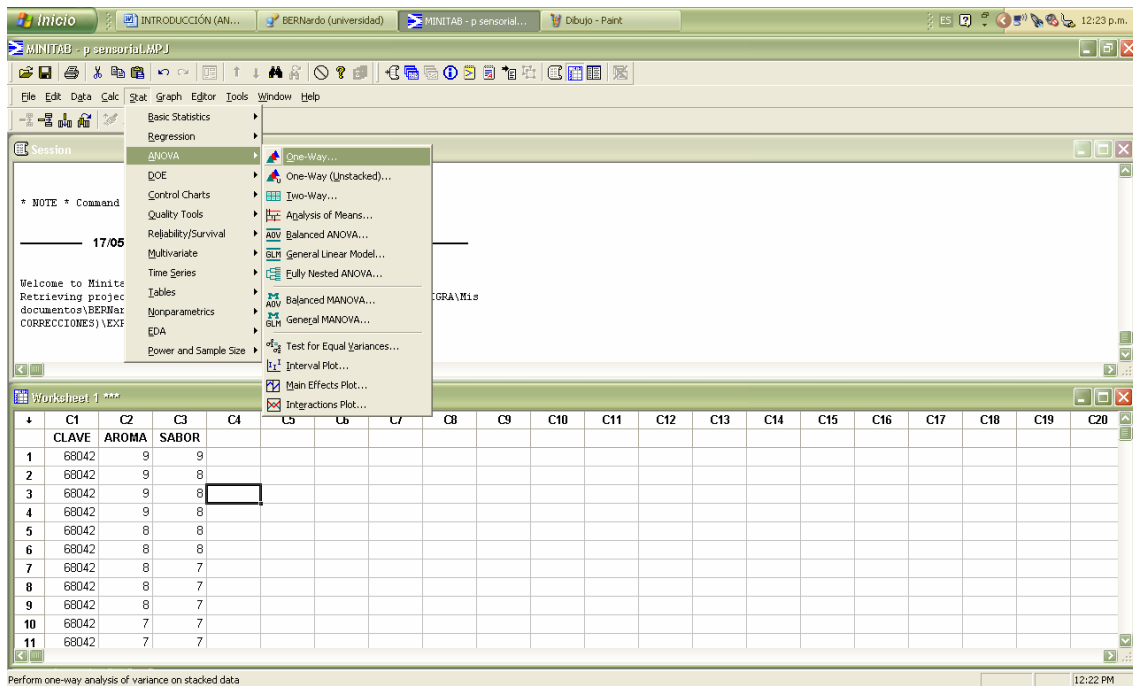


Figura 18. Paso de selección del método de análisis.

- Selección de la respuesta para el análisis del resultado, como se muestra en la figura 19.

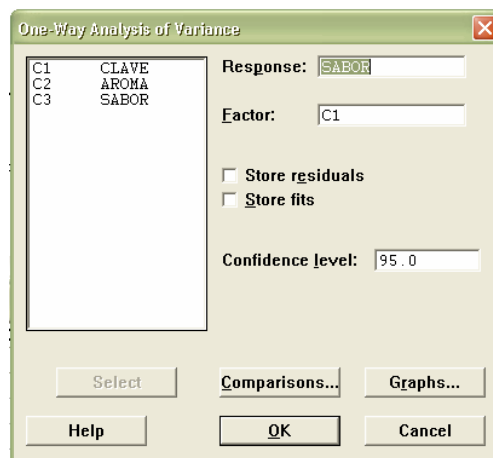


Figura 19. Selección de respuesta a analizar.

- El siguiente paso es seleccionar el tipo de comparación que se aplicara para evaluar las respuestas obtenidas, como se muestra en la figura 20. El tipo de comparación a utilizar en la de Turkey's, en la cual se selecciona un valor de error de 5.

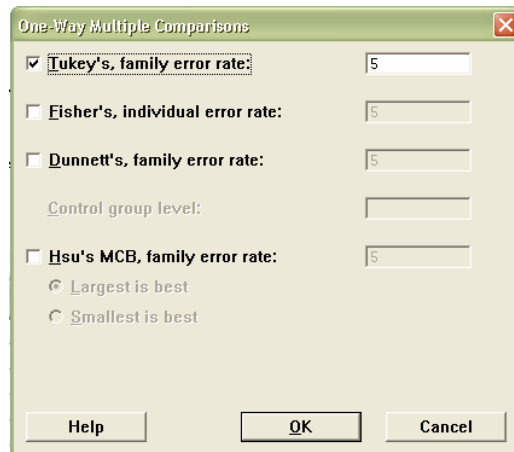


Figura 20. Selección del tipo de comparación.

- El siguiente paso es seleccionar el botón “ok” para poder hacer las determinaciones que fueron requeridas con anterioridad, como se mostró en la figura 18 y 19. Los resultados pueden ser analizados en el ANEXO F.