

CAPITULO VI

MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención de la pulpa

El tamarindo (*Tamarindus indica L.*) fue adquirido de la zona semiárida del estado de Michoacán aproximadamente con un peso de 60 kg de fruta, la cual fue directamente tratada con el productor, las operaciones de pelado y/o descascarillado se efectuaron manualmente, se utilizó 1 lt de agua por cada 2 kg de tamarindo para el remojo de la fruta durante un periodo de 24 horas, al término del tiempo de remojo la fruta se hizo pasar a través de un pulpeador (Speed-Trol, Sterling Electric, Estados Unidos) a velocidad baja, repitiendo la operación para separar totalmente las partes no comestibles de la fruta como las semilla y venas. La pulpa obtenida se vertió en bolsas plásticas de sello hermético vertiendo en cada una de ellas 1 kg de pulpa, la pulpa se almacenó en un congelador a -40°C (Sevco, Estados Unidos) temperatura a la cual nos aseguramos no tendrán ninguna actividad enzimática, o degradación de nutrientes hasta su transformación en los subproductos previa su descongelación. (Argaiz y López Malo, 1996).

6.2 Caracterización de la pulpa de tamarindo

6.2.1 Determinación de °Brix (sólidos solubles)

La determinación de grados Brix° de la pulpa se determinó por triplicado con el uso de un refractómetro manual ATAGO a 25°C.

6.2.2 Determinación de pH

Se determinó el pH por triplicado por inmersión del electrodo en la pulpa, utilizando un potenciómetro digital Beckman de precisión 0.05 unidades.

6.2.3 Acidez Titulable

Se determinó por triplicado, con la muestra diluida 1:4 pulpa y agua destilada, utilizando una solución de hidróxido de sodio al 0.1 N (Merck, Alemania) previamente valorada y

agregándola hasta el punto de vire con fenoftaleína al 0.1% usada como indicador ácido base. El resultado o los mililitros gastados se expresan como porcentaje de ácido tartárico que es el ácido mayoritario presente en la fruta.

$$\%acidez = \frac{(V_{NaOH})(N_{NaOH})(m_{eq} Ac.Tartarico)(100)}{peso - muestra} \quad (1)$$

donde: V es el volumen de NaOH desplazado, N la normalidad del NaOH y m_{eq} los miliequivalentes para el ácido tartárico 0.075.

6.3 Estandarización de los productos

Considerando los resultados de la caracterización de la pulpa de tamarindo y en base a los resultados obtenidos, se estandarizó la relación °Brix-acidez para la preparación del néctar y puré de tamarindo, tomando como referencia las características de los productos comerciales existentes en el mercado nacional, llevando a cabo una mezcla del puré con jarabe de sacarosa tratando de mantener el producto final con un pH < 4.0.

Primeramente las bolsas herméticas con la pulpa se colocaron en un refrigerador a 5°C (Torrey, USA) hasta su descongelación (Argaiz, 1998; Argaiz & López-Malo, 1996).

El puré de tamarindo preparado tiene una relación 1:1 de AGUA: PULPA, considerando también el agua que se le adicionó a la fruta para poder extraer la pulpa, ya que fue necesario adicionar agua para poder trabajar la fruta en el pulpeador, agregando nuevamente para la preparación del puré 1 lt de agua por cada 2 Kg de pulpa de tamarindo.

Para la elaboración del néctar la pulpa se mezcló con un jarabe de sacarosa 10° Brix en una proporción de 35:65 pulpa: jarabe de acuerdo al Codex Alimentarius (codex stan 122) que establece que un néctar debe incluir por lo menos 35% de pulpa.

6.4 Caracterización de los productos

Al puré y néctar de tamarindo se les determinó, al igual que a la pulpa de tamarindo, las características fisicoquímicas descritas anteriormente además de determinar las siguientes:

6.4.1 Color

En el néctar fresco y a las muestras tratadas térmicamente a las diferentes temperaturas, puré y néctar de tamarindo, se les determinó por triplicado los parámetros L, a y b de la escala Hunter usando un colorímetro (Gardner-Colorgard System 05, Estados Unidos) con estos valores se calcularon los siguientes parámetros, el tono (H), pureza (C), luminosidad (L) y diferencia neta de color (ΔE) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\Delta E = \sqrt{(a - a_o)^2 + (b - b_o)^2 + (L - L_o)^2} \quad (2)$$

$$H = \tan^{-1}\left(\frac{a}{b}\right) \quad (3)$$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (4)$$

Donde a_o , b_o y L_o son los valores de referencia del producto al tiempo cero del tratamiento térmico.

6.4.2 Ácido ascórbico

En la muestra fresca y después de cada tratamiento térmico efectuado se determina la concentración de ácido ascórbico por triplicado a cada una de las muestras siguiendo la técnica volumétrica del 2,6-diclorofenolindofenol, el cual se reduce por acción del ácido ascórbico mediante una reacción redox a una solución incolora. La vitamina se extrae

con mezclas de ácido meta-fosfórico y ácido acético y se titula con el 2,6-diclorofenolindofenol.

Se mezclan 2 ml de la muestra néctar o puré con 10 ml de la solución extractora de ácido meta fosfórico, se titula hasta el vire a color rosado con la solución del 2,6 diclorofenolindofenol.

Con los mililitros gastados de 2,6 diclorofenolindofenol y con la siguiente relación se obtienen los mg de ácido ascórbico/100 gr de porción comestible.

$$\frac{mgA.A.}{100g} = \frac{Factor * V}{A} \quad (5)$$

donde:

El factor se obtiene en base a dividir el número de mL tomado de la solución estandar (1 mg de A.A. en 1 mL de solución) entre el volumen gastado de 2,6 diclorofenol indofenol, A es la alícuota o número de mL tomado de puré o néctar de tamarindo y V es el volumen de 2,6 diclorofenol indofenol gastado en la titulación.

6.4.3 Determinación de la actividad enzimática (Pectinesterasa)

La actividad de la enzima pectinesterasa se realizó por la técnica del pH estático reportada por Argai (1996), primero se lleva a cabo la extracción de la enzima, en la cual se mezclan 10 ml del puré o néctar con igual volumen de una solución de NaCl 2M, ajustando a un pH de 7.8 y manteniéndola en estado de agitación por un periodo de una hora, además de estar en un baño de hielo a una temperatura menor a 4°C.

Después del tiempo de extracción enzimática, se tomó una alícuota de 10 ml de la solución resultante, a la cual se le agregó una solución de pectina al 1%, cuyo pH previamente se ajustó a 7.8, nuevamente se ajusta el pH de la mezcla a 7.8 y se mantiene en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se mide el pH y se titula con una solución de NaOH 0.004 M hasta llegar nuevamente a un pH de 7.8, esto se realiza a una temperatura de 25°C, con el volumen registrado y en base a la siguiente expresión, se obtienen las unidades de pectinesterasa UPE/mL (meq/mL) donde la actividad de la

enzima se expresa en microequivalentes de éster hidrolizados durante el tiempo de tratamiento por mL de puré o néctar.

$$UPE / ml = \left(\frac{v \times \frac{N}{1000}}{t \times a} \right) \times 10^6 \quad (6)$$

donde:

<i>v</i>	Volumen de la solución NaOH usado para la titulación
<i>N</i>	Normalidad de la solución de NaOH usada para la titulación
<i>t</i>	Tiempo de agitación
<i>a</i>	alícuota

6.4.4 Pruebas microbiológicas

Recuento de la flora nativa para el puré y néctar de tamarindo

Se realizó el conteo microbiano inicial para ambos productos, tomando la muestra de néctar o puré realizando diluciones en agua peptonada (hasta la 10^{-3}), tomando 1 mL y sembrando en cajas Petri con agar nutritivo (Merck, Alemania) para mesófilos aerobios y agar papa dextrosa (PDA Merck, Alemania) acidificado con ácido tartárico al 10% a un pH de 3.5 (1 mL/100 mL agar) para mohos y levaduras, las cajas se incubaron durante 24 horas a 25° C (temperatura ambiente) para mohos y levaduras y 48 horas a 35° C en estufa (Imperial III Incubator) para mesófilos aerobios, realizando el conteo en un cuenta colonias (Erma Optical Works, Ltd.).

6.5 Aplicación de los tratamientos térmicos

Se utilizara la técnica propuesta por Bigelow & Esty (1920), en la cual 10 ml de néctar o puré se colocarán en tubos Pyrex (13.5 x 160 mm) y se llevarán a un baño termostatado (Lab-line, Imperial IV, Estados Unidos) a temperatura constante y por periodos de tiempo establecidos, posteriormente al terminar el tiempo de tratamiento los tubos se llevarán a un baño de hielo a 0°C. Se trabajarán con temperaturas en un intervalo de 75-88° C, registrándose la evolución de la temperatura dentro de los tubos con muestra

utilizando termopares tipo T colocados en el centro geométrico de los tubos conectados a un lector de temperaturas (Cole-Parmer Barrington IL)., tomando las lecturas para elaborar las curvas de penetración de calor para cada temperatura de trabajo.

Se trataron térmicamente las muestras de puré y néctar de tamarindo a 75, 80, 85 y 88° C a diferentes tiempos que se determinaron de acuerdo al parámetro a evaluar.

Inactivación enzimática	0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min.
Color	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min.
Vitamina C	0, 1, 2, 3, 4, 5 min.

Al finalizar los tratamientos térmicos los tubos con la muestra se colocaron en un baño de hielo de entre 0 y 2° C.

Las muestras al alcanzar la temperatura de trabajo respectiva se le consideró como tiempo 0, y el tiempo en alcanzar dicha temperatura o tiempo CUT nos ayuda para efectuar la corrección de los parámetros de inactivación térmica obtenidos para cada parámetro evaluado.

6.6 Determinación de los valores k y D de las cinéticas de degradación de los parámetros evaluados

Con los datos obtenidos de los diferentes parámetros color, vitamina C, inactivación enzimática se elaboraron las gráficas respectivas para cada parámetro, relacionando los valores obtenidos a los diferentes tiempo de tratamiento con el tiempo cero (en el cual se alcanzó la temperatura de trabajo), graficando el logaritmo natural de la sustracción de estos valores con respecto al tiempo para el caso de la inactivación enzimática para obtener la cinética de degradación de primer orden.

De los valores de las pendientes obtenidas para cada una de las gráficas, el valor absoluto corresponde a los valores de la constante de proporcionalidad (k) para cada

temperatura, los valores de reducción decimal (D), se obtuvieron con la siguiente relación $D = 2.303/k$.

6.7 Obtención de los valores z

Los valores de z se obtuvieron al graficar el logaritmo del valor D con respecto a la temperatura para cada uno de los parámetros y para el puré y néctar. Al regresionar y obtener el valor de la pendiente se tiene que el valor de z es el inverso positivo de dicho valor.

6.8 Obtención de los valores de la energía de activación (Ea)

Para obtener la energía de activación (Ea), para cada uno de los parámetros estudiados del puré y néctar de tamarindo se regresionó el logaritmo natural de los valores de la constante de velocidad (k), contra el inverso de la temperatura absoluta (°K); donde el valor de la Ea se obtiene de multiplicar el valor absoluto de la pendiente obtenida por el valor de la constante de los gases ideales R (1.987 cal/g.mol.°K).

6.9 Determinación de los tiempos de inactivación térmica (TIT)

Se mezclaron 30 ml de solución de pectina al 0.05% con 30 mL de la muestra tratada térmicamente de néctar o puré, se ajustó el pH a 7.8 con NaOH 0.1N y se añadieron 180 ml de agua destilada, finalmente se le agregó 1 mL de una solución de CaCl₂ 1N y 3 gotas de tolueno. La mezcla se incubó a 30° (Imperial III Incubator modelo 310) durante 48 h.

Después del tiempo de incubación, se midió la viscosidad en un viscosímetro (Brokfield, DV-1) empleando una aguja H1 trabajando a una velocidad de 100 rpm.

Se preparó un sistema control con la muestra tratada térmicamente en una autoclave estática (Yamato SM300 Sterilizer) a 121°C por 15 minutos.

Un valor mayor en la viscosidad de las muestras comparado con el control indica la actividad de la enzima pectinesterasa siendo positiva la prueba, así como si el valor es

menor al del control se le considera una prueba negativa o actividad nula por parte de la enzima.

6.10 Determinación del primer cambio en sabor

Se realizaron pruebas a un pequeño grupo (6 personas) para delimitar el tiempo necesario para desarrollar cambios en sabor en base a los valores D de la enzima.

La aplicación de la prueba sensorial final se determinó usando la técnica de evaluación por pruebas triangulares para determinar cual de las 3 muestras que se presentan es diferente a las otras dos (Apéndice D).

La significancia de los resultados obtenidos se determinó utilizando la tablas de Larmond (1970) (Apéndice F) donde dependiendo del número de aciertos de la prueba triangular se determina el nivel de significancia, los niveles de significancia son del 5%, 1% y 0.1%, por lo que los niveles de confianza son del 95, 99 y 99.9%, eligiendo la de 95% de confianza para los datos obtenidos.

Con la prueba sensorial se determinó el tiempo necesario para desarrollar cambio en sabor (TFCF), el cual se manejó como el primer cambio perceptible al paladar de los jueces. El valor del parámetro z se obtuvo a partir de la regresión del log del tiempo mínimo requerido para que la muestra muestre una diferencia estadísticamente significativa en el sabor y el tiempo máximo de calentamiento para que la muestra no muestre ningún cambio en sabor contra la temperatura.