

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materias primas

En esta investigación se emplearon como materias primas guayabas (*Psidium guajava*) de la variedad de pulpa blanca, cosechadas en Calvillo, Michoacán. Éstas fueron adquiridas en un supermercado local.

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de pulpa de guayaba

La obtención de pulpa de guayaba se efectuó siguiendo Buenas Prácticas de Manufactura (NOM-120-SSA1, 1994) y usando modificaciones a la metodología propuesta por Esquivel y Guerrero (2004). La fruta se pesó y se lavó perfectamente por inmersión en agua; se seleccionaron las guayabas maduras y se eliminaron aquéllas que presentaron signos de descomposición. La fruta se partió en cuatro partes y se molió en un pulpeador de acero inoxidable (Langsenkamp, EE.UU); la pulpa se extrajo usando una malla con apertura de 0.5 mm y se recolectó en la parte posterior del equipo. Al finalizar el despulpado, la pulpa se colocó en bolsas de polietileno y se almacenó a -40 °C en un congelador REVCO (EE.UU). Posteriormente, la pulpa se caracterizó en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (°Bx, pH, acidez titulable, vitamina C, actividad enzimática, color) y microbiológicas (bacterias mesófilas aerobias, hongos y levaduras).

6.2.2 Formulación del néctar de guayaba

El néctar de guayaba se formuló de acuerdo con las especificaciones del Codex Alimentarius (1985) el cual establece un contenido mínimo de ingrediente de fruta del 25 % (p/v) y un contenido máximo de 20 grados Brix ajustados con uno o más de los siguientes azúcares: sacarosa, fructosa, glucosa, dextrosa.

6.2.3 Elaboración del néctar de guayaba

La elaboración del néctar de guayaba se llevó a cabo de acuerdo con descrito por Esquivel y Guerrero (2004) con las siguientes modificaciones: la pulpa de guayaba se descongeló a 4 °C en un refrigerador TORREY (R-13, México) durante 18 h. A continuación, se pesaron la pulpa, la sacarosa y el agua; los ingredientes se colocaron en un recipiente de plástico y se mezclaron usando una batidora de inmersión (Oster, 2609, México) hasta lograr su completa integración. A la mezcla obtenida se le determinaron los grados Brix, mediante un refractómetro (Atago, Japón), y el pH, con un potenciómetro (Jemway, 3310, Reino Unido). Finalmente, la mezcla se cubrió de la luz y se realizaron las determinaciones y los tratamientos de forma inmediata.

6.2.4 Determinación de los parámetros cinéticos de la inactivación térmica de PME

Para la obtención de los parámetros cinéticos, muestras con 7 mL de néctar fueron sometidas a temperaturas de 60, 65 y 70 °C a diferentes tiempos en un baño de agua con agitación (Universidad de Purdue, EE.UU.). Al finalizar el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en un baño de hielo, se refrigeraron a 4 °C y se les determinó su actividad enzimática. Para la corrección del tiempo de subida (CUT), se tomó como el tiempo cero (t_0) el valor de actividad enzimática de la muestra cuando alcanzó la temperatura deseada.

Con los datos de actividad obtenidos, se graficó el logaritmo de la fracción remanente de actividad enzimática ($\log(C/C_0)$) contra el tiempo de tratamiento para obtener la cinética de inactivación de primer orden mediante regresión lineal, en donde el valor D es igual al inverso de la pendiente. Los valores de la constante de velocidad, se obtuvieron mediante la Ec. 8 (Toledo, 2007):

$$k = \frac{2.303}{D} \quad (\text{Ec. 8})$$

El valor z se obtuvo del inverso positivo de la pendiente resultante de graficar el logaritmo de D contra temperatura ($^{\circ}\text{C}$). El valor de energía de activación se obtuvo sustituyendo la pendiente (m) del logaritmo natural de la constante de la velocidad (k) contra el inverso de la temperatura absoluta (K) en la Ec. 9 (Toledo, 2007):

$$Ea = -mR \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde:

Ea : energía de activación (J/mol)

R : constante universal de los gases ($\text{J/mol}\cdot\text{K}$)

6.2.5 Procesamiento de guayaba en un sistema de microondas por lotes

6.2.5.1 Eficiencia del horno de microondas

Para calcular la eficiencia del horno de microondas, se tomaron los datos de potencia de salida reportados por Villa-Rojas (2010) para el mismo sistema de microondas (60 % potencia= 500 W y 100 % potencia =950 W). La eficiencia del equipo se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Eficiencia (\%) = \frac{Potencia\ real\ (W)}{Potencia\ nominal\ (W)} \times 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

El equipo de microondas tuvo una eficiencia del 75 % al usar el 100 % de potencia, y un 69.4 % al usar el 60 % de potencia.

6.2.5.2 Calentamiento por microondas

El procesamiento del néctar de guayaba se llevó a cabo por calentamiento en un sistema de microondas a 2450 MHz (Panasonic, 1200 W, China) con las siguientes

dimensiones en la cavidad: 21 cm de alto, 45 cm de ancho y 39 cm de largo. Para el calentamiento, se emplearon cuatro frascos de vidrio de 200 mL que se llenaron con 125 mL de néctar de guayaba. Las muestras se situaron en el centro de la cavidad del horno de microondas y se les introdujeron sensores de fibra óptica (MWS, Fiso Technologies, Canadá) que registraron la temperatura desde el centro de la muestra durante el tratamiento. Partiendo con una temperatura inicial de 30 °C, las muestras se calentaron a 90 °C a 500 y 950 W por 9 y 11 segundos (tiempo de retención), respectivamente. Al finalizar el tratamiento, se removieron los sensores de fibra óptica, se taparon los frascos y las muestras se enfriaron en un baño de hielo a 4 °C en donde se monitoreó la temperatura mediante termopares (DigiSense, ThermoFisher Scientific, EE.UU.) colocados en el centro de las muestras (Fig. 16). Los tratamientos con microondas se llevaron a cabo por triplicado. El volumen de muestra empleado (125 mL) se determinó de acuerdo al volumen total requerido para los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

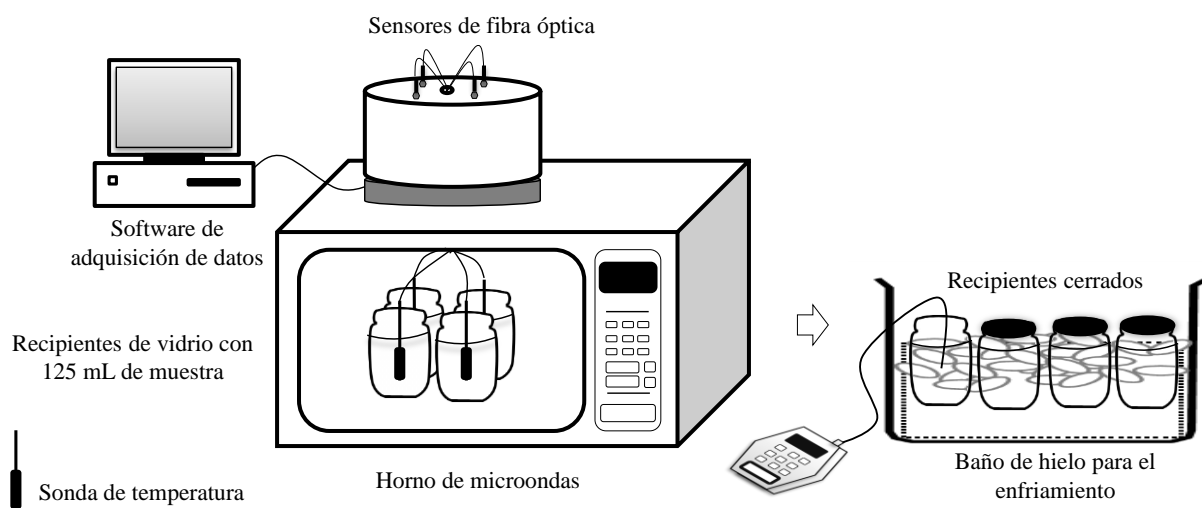


Fig. 16 Equipo de microondas utilizado para el procesamiento de néctar de guayaba

A lo largo del este trabajo a las muestras tratadas a 500 y 950 W se les denominará como MW500 y MW950, respectivamente.

6.2.5.3 Calor absorbido durante el calentamiento por microondas

El calor (Q) absorbido por el néctar de guayaba durante el procesamiento con microondas se evaluó de acuerdo a lo descrito por Tajchakavit y Ramaswamy (1997) mediante la siguiente ecuación, asumiendo que no hubieron pérdidas de calor hacia los alrededores:

$$Q = mC_p(T_f - T_i) \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

Q= Calor absorbido (kJ)

m= Masa de la muestra (kg)

C_p= Calor específico de la muestra (kJ/(kg°C))

T_f= Temperatura final (°C)

T_i= Temperatura inicial (°C)

El valor de Q calculado se convirtió a potencia absorbida (P) dividiendo entre el tiempo de calentamiento, para obtener el valor en watts (Apéndice A). De esta manera, P se comparó con la potencia de salida del horno de microondas.

La densidad del néctar de guayaba se determinó experimentalmente mediante picnómetros de acuerdo a Burns (2003), con tres réplicas. El valor del calor específico se predijo usando el modelo de Dickerson para jugos de frutas (Ec. 12) como lo indica Heldman y Singh (1981):

$$C_p = 1.675 + 0.025 * m_w \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde:

C_p= Calor específico (kJ/kg°C)

m_w= Contenido de humedad (g de agua/100g de muestra)

El contenido de humedad del néctar de guayaba se determinó por triplicado por gravimetría, de acuerdo al método 934.06 de la A.O.A.C (2000).

6.2.6 Evaluación del procesamiento con microondas en función de la inactivación de pectinmetilesterasa

Con los perfiles de temperatura obtenidos, se calculó la letalidad o eficacia letal a una temperatura T con respecto a la temperatura de referencia T₀ mediante la siguiente ecuación (Toledo, 2007):

$$L = [10]^{T-T_0/z} \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde:

L: letalidad

T: Temperatura (°C)

T₀: Temperatura de referencia (T₀= 90 °C (Chen y Wu, 1991))

Z: Valor z para la enzima pectinmetilesterasa (z= 8.9 °C (Chen y Wu, 1991))

La letalidad del proceso se calculó por integración gráfica de la curva de letalidad contra tiempo usando el “método general” de acuerdo a Toledo, (2007):

$$F_0^z = \int_0^t L_t dt \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde:

F₀^z: letalidad del proceso

El valor de F₀^z calculado se comparó con el valor de F₀ teórico (F₀= 0.27 min a 90 °C, 5D) para determinar si el tratamiento fue adecuado, insuficiente o en exceso para la inactivación de la enzima pectinmetilesterasa. Los tiempos de retención fueron ajustados para alcanzar el F₀ teórico y de esta manera se establecieron las condiciones

de pasteurización con microondas para el néctar de guayaba: 90 °C por 11 s a 500 W y 90 °C por 9 s a 950 W.

6.2.7 Procesamiento de néctar de guayaba en un sistema de calentamiento convencional

El tratamiento de pasteurización convencional se llevó a cabo en un intercambiador de calor de placas de nivel laboratorio (ARMPFIELD FT74P, EE.UU.) de la Universidad de Purdue (EE.UU.) conformado por un sistema de calentamiento, enfriamiento, medidores de presión y temperatura (Fig. 17). El tratamiento se realizó de acuerdo con la metodología recomendada por el fabricante. El flujo volumétrico se estableció en función de las dimensiones del tubo de retención y el tiempo requerido para la inactivación de la enzima pectinmetilesterasa (Apéndice B) de acuerdo a lo reportado por Chen y Wu (1991). El néctar de guayaba se procesó a 90 °C por 3 segundos a razón de 0.8 L/min y se recolectó en botellas de vidrio estériles para su almacenamiento. Las corridas se llevaron a cabo por triplicado.

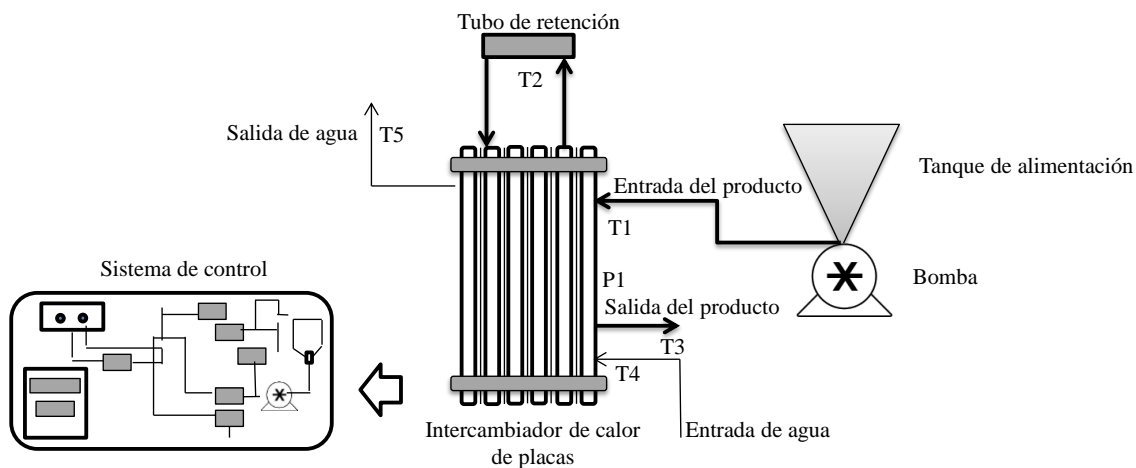


Fig. 17 Intercambiador de calor de placas empleado en el procesamiento de néctar de guayaba

6.2.8 Determinación de la acidez titulable

La acidez titulable (expresada como porcentaje de ácido cítrico) se determinó por titulación con NaOH 0.1 N de acuerdo con el método 952.53 de la A.O.A.C. (2000). Para la determinación, se emplearon 10 mL muestra y fenolftaleína como indicador del vire. El porcentaje de acidez se calculó usando Ec. 15:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{V \times N \times 6.4}{v} \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde:

V: mL de NaOH usados en la titulación

N: Normalidad del NaOH

v: Volumen de muestra

La determinación se llevó a cabo por triplicado.

6.2.9 Determinación del contenido de vitamina C (ácido ascórbico)

La determinación de ácido ascórbico en el néctar se llevó a cabo por titulación con 2,6 diclorofenolindofenol de acuerdo al método 967.21 de la A.O.A.C. (2000).

Se emplearon tres soluciones: una solución extractora (mezcla de ácido metafosfórico, ácido acético y agua) una solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol y una solución estándar de ácido ascórbico. Para la preparación de la solución extractora se trituraron 15 g de ácido metafosfórico (HPO_3) en un mortero. El ácido metafosfórico se colocó en 40 mL de ácido acético glacial y 200 mL de agua; la mezcla se agitó hasta disolver completamente los cristales de ácido metafosfórico y se llevó a 500 mL con agua destilada.

La solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol se preparó disolviendo 50 mg de 2,6-diclorofenolindofenol y 42 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en 50 mL de agua destilada; la mezcla se agitó hasta la completa desintegración de los componentes usando agitación magnética; la solución se aforó a 200 mL usando agua destilada.

Para preparar la solución estándar de ácido ascórbico se colocaron 100 mg del mismo en un matraz aforado de 100 mL y se diluyó hasta la marca del aforo con la solución extractora.

Posteriormente, en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se colocaron 2 mL de la solución estándar de ácido ascórbico, y se agregaron 5 mL de solución extractora. La mezcla se tituló inmediatamente con la solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol hasta observar la aparición de un color rosa ligero. La valoración se realizó por triplicado.

Se tituló un blanco compuesto por 7 mL de la solución extractora más el volumen gastado (en agua) en la titulación del estándar de ácido ascórbico, hasta observar el tono rosa. La valoración se realizó por triplicado.

Para la determinación de ácido ascórbico en la muestra, en un vaso de precipitados de 250 mL se colocaron 50 mL de muestra y 50 mL de la solución extractora. Enseguida, se transfirió una alícuota de 2 mL de la mezcla muestra-solución extractora a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se añadieron 5 mL de la solución extractora; se mezcló perfectamente y se tituló con la solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol hasta observar el vire de color rosa. La determinación se realizó por triplicado.

La cantidad de ácido ascórbico presente en la muestra se determinó con la siguiente fórmula:

$$mg \text{ ácido ascórbico} / mL = (X - B) \times (F/E) \times (V/Y) \quad (\text{Ec. 16})$$

Donde:

X: Volumen de solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol para titular la muestra diluida en la solución extractora (mL)

B: Volumen de solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol para titular el blanco (mL)

F: mg de ácido ascórbico/mL de solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol para titular la solución estándar de ácido ascórbico

E: Volumen de néctar de guayaba (mL)

V: Volumen de la mezcla muestra-solución extractora (mL)

Y: Alícuota de la mezcla muestra-solución extractora (mL)

6.2.10 Determinación de la actividad de la enzima pectinmetilesterasa

6.2.10.1 Preparación de la solución de pectina al 1 %

En un vaso de precipitados de 400 mL se colocaron 200 mL de solución de NaCl 0.2 M y se introdujo una barra magnética. La solución se agitó a velocidad alta y enseguida se adicionaron lentamente 2.5 g de pectina cítrica evitando la formación de grumos. Una vez disuelta la pectina, la mezcla se aforó a 250 mL con la solución de NaCl (Rouse y Atkins, 1953).

6.2.10.2. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Rouse y Atkins, (1953) .Se colocaron 50 mL de solución de pectina al 1 % y 5 mL de muestra en un vaso de precipitados de 100 mL; la mezcla se mantuvo en agitación usando una barra magnética. A continuación, el pH se ajustó a 7 con NaOH 0.1 N. La mezcla se calentó en un baño de agua a 30 °C y se dió inicio al ajuste de pH con NaOH 0.1 N cada dos minutos durante diez minutos registrando la cantidad de sosa acumulada en cada intervalo de tiempo (Fig. 18). La determinación se realizó por triplicado.

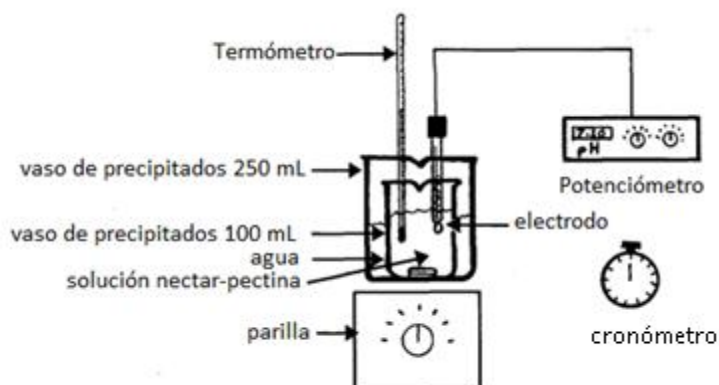


Fig. 18 Determinación de la actividad enzimática (Kimball, 1991)

Para calcular las unidades de actividad enzimática se graficaron los datos obtenidos del volumen acumulado de NaOH frente al tiempo y se obtuvo la pendiente de la recta con regresión lineal. El valor obtenido se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$U.A.E = \frac{mN}{V} \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde:

U.A.E : Unidades de actividad enzimática (meq/mL-min)

m: Pendiente de volumen de NaOH contra tiempo (mL/min)

N: Normalidad del NaOH

V: Volumen de muestra empleado (mL)

El resultado obtenido se expresó como U.A.E/mL los cuales representan los microequivalentes de ácido liberados por minuto por mL de néctar a pH 7 y 30 °C (Rouse y Atkins, 1953).

6.2.11 Evaluación del color

La medición de los parámetros colorimétricos se llevó a cabo en un colorímetro (Gardner-Color, Gardner System 05, Alemania) empleando el modo de reflectancia de acuerdo con la metodología recomendada por el fabricante. Para la determinación, se calibró el equipo con una placa negra y una placa blanca. En un vaso de precipitados de 50 mL, se colocaron 20 mL de muestra y se midieron las coordenadas colorimétricas correspondientes a la escala de CIELAB: L^* (luminosidad), a^* (variación verde a rojo) y b^* (variación azul a amarillo).

Para el néctar pasteurizado en un intercambiador de calor de placas la medición de los parámetros colorimétricos CIELAB se efectuó usando 50 mL de muestra en un colorímetro Lab Scan XE (Hunter Lab, EE.UU.) de la universidad de Purdue (EE.UU.) con iluminante D65 y observador estándar de 10° .

Las mediciones de color se llevaron a cabo por triplicado.

Con base en los parámetros descritos, se calculó la diferencia neta de color (ΔE^*) entre el néctar de guayaba fresco y el néctar de guayaba pasteurizado de acuerdo con la siguiente ecuación (Sharma, 2003):

$$\text{Diferencia neta de color } (\Delta E^*) = \sqrt{(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L^* - L_0^*)^2} \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde:

a_0^*, b_0^*, L_0^* : Valores correspondientes al néctar fresco

a^*, b^*, L^* : Valores correspondientes al néctar pasteurizado

6.2.12 Determinación de las propiedades reológicas

Las propiedades reológicas se determinaron a partir de las propiedades de flujo obtenidas con un viscosímetro Brookfield DV-III (Midleboro, EE.UU.) de acuerdo con la metodología recomendada por el fabricante. Las propiedades de flujo se midieron por triplicado a 25°C usando el adaptador de muestra pequeña (SSA) con 10 mL de néctar.

Se empleó la aguja SC4-31 y se corrió un programa de 10 pasos, de 10 a 100 rpm, con una rampa de 30 segundos.

Para la obtención de las propiedades reológicas, los valores obtenidos de esfuerzo cortante (τ) y velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) se ajustaron al modelo Ley de Potencia usando Ec. 19 (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005):

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. 19})$$

Donde:

τ : Esfuerzo cortante (Pa)

K: Coeficiente de consistencia (Pa*s)

$\dot{\gamma}$: Velocidad de deformación (1/s)

n: Índice de flujo (adimensional)

Los valores de índice de flujo n y coeficiente de consistencia se obtuvieron mediante la regresión lineal de los datos de esfuerzo cortante y velocidad de deformación. El ajuste del modelo se evaluó a través del porcentaje de error medio (PEM) y el coeficiente de determinación (R^2).

La viscosidad aparente se determinó de acuerdo a lo descrito por Cabral *et al.* (2007) y Tiban *et al.*, (2003) mediante la siguiente fórmula:

$$\mu_{ap} = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde:

μ_{ap} : Viscosidad aparente (Pa*s)

K: Coeficiente de consistencia (Pa*s)

$\dot{\gamma}$: Velocidad de deformación (1/s)

n: Índice de flujo (adimensional)

6.2.13 Determinación de la cuenta total de microorganismos

A las muestras se les determinó la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras. El recuento de mesófilos aerobios se efectuó por triplicado de acuerdo a la metodología propuesta por la NOM-092-SSA1-1994 (1995). La siembra se realizó en agar cuenta estándar (Becton Dickinson S.A, EE.UU.) a partir de una dilución 10^{-1} de la muestra en agua peptonada estéril. Las cajas se incubaron en posición invertida a 35 °C por 48 h.

El conteo de hongos y levaduras se llevó a cabo por triplicado de acuerdo a lo descrito por la NOM-111-SSA1-1994 (1995); la siembra se realizó en profundidad en agar papa dextrosa (Oxoid, S.A, Reino Unido) acidificado con ácido tartárico al 10 % y las cajas se incubaron a 25 °C por 72 h. El recuento del crecimiento de las colonias se realizó en un cuenta colonias Erma (Optical Works Ltd., Japón).

6.2.14 Almacenamiento

Los néctares pasteurizados así como una muestra testigo (sin tratamiento) se almacenaron en frascos de vidrio a 4 °C en un refrigerador TORREY (R-13, México) por un periodo de 12 días. Las muestras fueron analizadas cada 4 días durante el periodo de almacenamiento.

6.2.15 Evaluación sensorial

Se realizó una prueba sensorial afectiva para conocer la aceptabilidad de la formulación del néctar de guayaba. Se empleó una escala hedónica de 9 puntos en la cual se asignó la mayor puntuación a “gusta en extremo” y la menor puntuación a “disgusta en extremo”. A los jueces se les presentaron tres formulaciones diferentes de néctar de guayaba: a) 25 % pulpa, 15 °Bx, b) 25 % pulpa, 20 °Bx, c) 30 % pulpa, 20 °Bx y se eligió aquella que presentó la mayor puntuación en análisis estadístico de los resultados.

Durante el almacenamiento se efectuó una prueba triangular para detectar si existieron diferencias o no entre el néctar fresco y el tratado con microondas. Además,

se realizó una prueba afectiva para conocer el nivel de agrado del néctar pasteurizado con microondas usando una escala hedónica de 9 puntos.

Todas las pruebas se llevaron cabo con la participación de 20 jueces no entrenados entre 19 y 59 años de acuerdo por lo descrito por Stone y Sidel (2004).

6.2.16 Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existieron diferencias significativas al 95% de confianza usando el paquete estadístico MINITAB (v.15). Cuando hubo diferencias, se aplicó la prueba de Tukey (prueba post-ANOVA).

6.2.17 Entrenamiento para el manejo de un sistema de microondas continuo

La preparación para el manejo de un equipo de microondas de flujo continuo de nivel laboratorio (3 kW, 2450 MHz) se llevó a cabo en las instalaciones del departamento de "Food Science" de la Universidad de Purdue, en Indiana, Estados Unidos (Apéndice C).