

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA OBTENCIÓN DE JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ (*Eugenia Stipitata*), MEDIANTE PROCESOS ENZIMÁTICO Y MEMBRANARIO

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

JORGE LUIS LAVERDE ACURIO

jorllaverde@yahoo.com

DIRECTORA: ING. BEATRIZ BRITO GRANDES, M.Sc.

bbrito@uio.satnet.net

CODIRECTORA: ING. JENNY RUALES, Ph.D.

jruales@pi.pro.ec

Quito, Noviembre 2010

© Escuela Politécnica Nacional 2010
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Jorge Luis Laverde Acurio, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Jorge Luis Laverde

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por el Sr. Jorge Luis Laverde Acurio, bajo mi supervisión.

Ing. Beatriz Brito Grandes, M.Sc.

DIRECTORA DE PROYECTO

Ing. Jenny Ruales, Ph.D.

CODIRECTORA DE PROYECTO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del Programa de Fortalecimiento Institucional. Componente V: Plan e Investigaciones para Agroindustria, Energía y Nutrición. Proyecto: Valorización de cultivos y materias primas, para respaldar las certificaciones de origen; desarrollar y aplicar procesos tecnológicos y agroindustriales, a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad, a lo largo de la cadena agroproductiva. El que se ejecuta en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP

AGRADECIMIENTO

Principalmente a mis padres: Jorge y Teresa, y hermanas: Rosario, Patricia, Yolanda y Cecilia, y a mi cuñado Carlos que siempre me han brindado todo el apoyo y confianza en mis decisiones personales y profesionales.

A la Escuela Politécnica Nacional y sus docentes, por los conocimientos impartidos y por toda la ayuda prestada durante mi etapa de formación profesional. Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias y por su intermedio al Departamento de Nutrición y Calidad, que me brindó la oportunidad para desarrollar mi Proyecto de Titulación.

Al Programa de Fortalecimiento Institucional del INIAP. Proyecto: Valorización de cultivos y materias primas, para respaldar las certificaciones de origen. Desarrollar y aplicar procesos tecnológicos y agroindustriales, a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad, a lo largo de la cadena agro productiva, por el financiamiento.

A la Ing. Beatriz Brito Grandes por brindarme su amistad, confianza, apoyo y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. A la Dra. Jenny Ruales, codirector de la tesis, por su acertada asistencia técnica y todo el apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación. Al Dr. Patricio Castillo, miembro del tribunal examinador, por su apreciable dedicación a la revisión de esta tesis.

A la Dra. Susana Espín, Responsable del Departamento de Nutrición y Calidad por su apoyo y motivación. A la Ing. Elena Villacrés, Dr. Iván Samaniego, Ing. Luis Egas, Sr. Bladimir Ortiz, Sra. Carmita Rosales, por su colaboración.

A mis amigos, Daniela, Verito, Wladimir, Christian, Rommel, Pato, Paola, Stephanie, Rafa, Andreita, Maribel, Fernanda, Vicky, Anita, Adriana, Priscila, Camilo y Yaris por haberme brindado su amistad incondicional y haber hecho grata mi permanencia en el EPN y el INIAP.

DEDICATORIA

A las personas más importantes de mi vida, mis padres Jorge y Teresa

*Que gracias a la formación que ellos me han enseñado
y por todo el amor y amistad que me han dado, he logrado cumplir con uno
de mis objetivos*

A mis hermanas Rosario, Patricia, Yolanda y Cecilia

Que les amo muchísimo y por la confianza que siempre han tenido en mí

y

A mi cuñado Carlos

Por todo el apoyo brindado

*Les dedico este trabajo que es fruto de mi esfuerzo y algo simbólico de todo
el cariño que tengo y que tan solo es el comienzo de todas las metas que
tengo en mi vida*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

		PÁGINA
	DECLARACIÓN	i
	CERTIFICACIÓN	ii
	RESUMEN	xiv
	INTRODUCCIÓN	xv
	ABREVIATURAS	xvii
1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1	Arazá (<i>Eugenia stipitata</i>)	1
1.1.1	Origen y clasificación botánica	1
1.1.2	Morfología general	3
1.1.3	Manejo agronómico del cultivo	3
1.1.3.1	Requerimiento del cultivo	3
1.1.3.2	Métodos de propagación	4
1.1.3.3	Prácticas culturales y producción	5
1.1.3.4	Principales plagas y enfermedades	5
1.1.3.5	Tecnología de cosecha y postcosecha	6
1.1.4	Composición química	7
1.1.5	Producción y usos	8
1.2	Enzimas hidrolíticas	9
1.2.1	Fundamentos teóricos de las enzimas	9
1.2.1.1	Cofactores enzimáticos	10
1.2.1.2	Principios de la catálisis y acción enzimática	10
1.2.1.3	Función de las enzimas	11
1.2.1.4	Regulaciones de las reacciones enzimáticas	11
1.2.1.5	Clasificación general de las enzimas	12
1.2.2	Clasificación y usos de las enzimas hidrolíticas	12
1.2.2.1	Las proteasas	13
1.2.2.2	Alfa amilasa	14
1.2.2.3	Lactasa	14
1.2.2.4	Invertasa	14
1.2.2.5	Pectinasas	14
1.2.2.6	Celulasas y hemicelulasas	15
1.3	La Pared celular de las frutas	15
1.3.1	Definición	15
1.3.2	Descripción general	15
1.3.3	Componentes de la pared celular	16
1.3.3.1	Lignina	17
1.3.3.2	Pectina	18
1.3.3.3	Celulosa	19
1.3.3.4	Hemicelulosa	20
1.3.3.5	Componentes menores	21

1.4	Tecnología de membranas	21
1.4.1	Procesos de separación	22
1.4.2	Principios y modos de operación	23
1.4.2.1	Filtración	23
1.4.2.2	Operaciones de membranas	23
1.4.3	Microfiltración tangencial	25
1.4.3.1	Concepto	25
1.4.3.2	Parámetros de influencia en el proceso de microfiltración tangencial	27
1.4.3.3	Membranas	31
1.4.3.4	Pre-tratamiento enzimático	37
1.4.3.5	Sistemas de operaciones	38
1.4.4	Usos de la microfiltración tangencial	
39		
2	PARTE EXPERIMENTAL	
41		
2.1	Materiales	41
2.2	Métodos	42
2.2.1	Caracterización de la pared celular	42
2.2.2	Selección del cóctel enzimático comercial para el tratamiento de la pulpa congelada de arazá	43
2.2.2.1	Factores de estudio	43
2.2.2.2	Unidad experimental	43
2.2.2.3	Análisis estadístico	44
2.2.2.4	Procedimiento	44
2.2.2.5	Métodos de control y evaluación	46
2.2.3	Optimización de las condiciones de trabajo en la microfiltración tangencial para la obtención de los mejores rendimientos del jugo clarificado de arazá	47
2.2.3.1	Factores de estudio	47
2.2.3.2	Unidad experimental	47
2.2.3.3	Análisis estadístico	47
2.2.3.4	Procedimiento	48
2.2.3.5	Métodos de control y evaluación	51
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1	Caracterización de la pared celular	53
3.1.1	Rendimientos en la extracción y purificación de la pared celular de arazá	53
3.1.2	Caracterización química de la pared celular de arazá	54
3.1.3	Caracterización de la pectina soluble en agua	55
3.2	Selección del cóctel enzimático comercial para el tratamiento de la pulpa congelada de arazá	56
3.2.1	Determinación de la temperatura del tratamiento enzimático	56

3.2.2	Selección del cóctel enzimático comercial	57
3.2.3	Selección del tiempo y la concentración del cóctel enzimático comercial seleccionado	59
3.3	Optimización de las condiciones de trabajo en la microfiltración tangencial para la obtención de los mejores rendimientos del jugo clarificado de arazá	67
3.3.1	Determinación de la presión transmembranaria óptima	67
3.3.2	Determinación del flujo de permeado (J_p) y del factor de reducción volumétrico (FRV) óptimos	68
3.3.3	Determinación de la relación entre la PTM y el FRV	73
3.3.4	Determinación del rendimiento de jugo clarificado de arazá en la MFT	76
3.3.5	Caracterización física-química y nutricional del permeado y retenido de arazá	78
3.3.6	Análisis sensorial del jugo clarificado de arazá	82
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
4.1	Conclusiones	84
4.2	Recomendaciones	86
	BIBLIOGRAFÍA	87
	ANEXOS	97

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.	Principales plagas que afectan al cultivo de arazá	6
Tabla 2.	Principales enfermedades que afectan a la planta de arazá	6
Tabla 3.	Composición química del arazá	7
Tabla 4.	Clasificación y función de las enzimas	12
Tabla 5.	Procesos de separación y sus características	25
Tabla 6.	Aplicaciones de la microfiltración tangencial	40
Tabla 7.	Tratamientos obtenidos en base al plan de experiencia con dos variables	46
Tabla 8.	Registro de datos del ensayo de microfiltración tangencial	50
Tabla 9.	Rendimientos de pulpa a fruta, de MIA a pulpa, de MIAA a MIA y de PSA a MIA de arazá	53
Tabla 10.	Caracterización química de la pared celular purificada, en la pulpa de arazá	54
Tabla 11.	Análisis del grado de esterificación en la pectina soluble en agua de arazá	56
Tabla 12.	Resultados del análisis sensorial duo-trío para la determinación de la temperatura del tratamiento enzimático	57
Tabla 13.	Caracterización de las principales actividades enzimáticas en cócteles comerciales	58
Tabla 14.	Caracterización de las principales actividades enzimáticas en cócteles comerciales	59
Tabla 15.	Control de calidad de los tratamientos en la pulpa enzimada de arazá	60
Tabla 16.	Pruebas de significación de Tukey al 5 %, a un FRV de 2,27	74
Tabla 17.	Pruebas de significación de Tukey al 5 %, a un FRV de 4,72	75

Tabla 18.	Pruebas de significación de Tukey al 5 %, a un FRV de 6,27	75
Tabla 19.	Caracterización física-química de diferentes productos de arazá	78
Tabla 20.	Resultados de la medición de color para diferentes productos de arazá	80
Tabla 21.	Composición nutricional del permeado y retenido del proceso de MFT con pulpa de arazá, en base fresca	81
Tabla 22.	Resultados de la prueba sensorial de preferencia	82

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.	Fruto de arazá	1
Figura 2.	Área de origen de <i>Eugenia stipitata</i> subsp.	2
Figura 3.	Azúcares componentes de los polisacáridos insolubles de la pared celular	17
Figura 4.	Estructura química de la pectina	18
Figura 5.	Estructura química de la celulosa	20
Figura 6.	Estructura química de la hemicelulosa	20
Figura 7.	Rangos de separación de diversos procesos, con base a sus propiedades	22
Figura 8.	Esquema de separación por membranas	24
Figura 9.	Esquema de un módulo de microfiltración tangencial	26
Figura 10.	Tipos de filtración	26
Figura 11.	Comportamiento del flujo del permeado durante la microfiltración	28
Figura 12.	Representación de una capa de polarización de concentración	31
Figura 13.	Representación esquemática de dos medios separados por una membrana	32
Figura 14.	Membranas orgánicas	33
Figura 15.	Membranas cerámicas tubulares multicanales	34
Figura 16.	Estructura de una membrana simétrica	34
Figura 17.	Estructura de una membrana asimétrica	35
Figura 18.	Tipos de configuraciones	36
Figura 19.	Esquema de un sistema discontinuo	39

Figura 20.	Esquema de operación continua	39
Figura 21.	Clon 003 de arazá	41
Figura 22.	Disposición de los diez puntos experimentales entorno a la circunferencia	45
Figura 23.	Descripción esquemática del modulo de MFT/UFT	49
Figura 24.	Superficie de respuesta del contenido de SIS para los tratamientos	63
Figura 25.	Superficie de respuesta de la solubilización para los tratamientos	64
Figura 26.	Superficie de respuesta para la consistencia en cada tratamiento	65
Figura 27.	Superficie de respuesta de la viscosidad cinemática para cada tratamiento	66
Figura 28.	Superficie de respuesta de la viscosidad dinámica para cada tratamiento	67
Figura 29.	Efecto de la presión transmembranaria sobre el flujo del permeado	68
Figura 30.	Relación entre J_p , FRV y el tiempo	69
Figura 31.	Comportamiento del J_p a tres valores PTM	70
Figura 32.	Relación entre el J_p y el FRV, en la pulpa de arazá con tratamiento enzimático	72
Figura 33.	Relación de la PTM y el FRV, con mediciones de J_p de la pulpa enzimada de arazá	73
Figura 34.	Diagrama de flujo del proceso optimizado para la obtención de jugo clarificado de arazá	77

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO A	
Manual de operación del equipo piloto de micro y ultra filtración tangencial	97
ANEXO B	
Métodos de análisis de laboratorio	102
ANEXO C	
Esquematización fotográfica del proceso para obtener jugo clarificado de arazá	130
ANEXO D	
Evaluación sensorial del nivel de preferencia del jugo clarificado de arazá	131
ANEXO E	
Probabilidad de X o más juicios correctos en n pruebas ($p = 1/3$)	133

RESUMEN

El desarrollo de este proyecto de titulación se realizó en dos fases. La primera fase estuvo constituida por la caracterización de la pared celular de la pulpa de arazá, la selección de cóctel enzimático comercial el tratamiento que involucró la temperatura, la concentración y el tiempo, con el que se obtuvo la mayor solubilización de la pulpa. En la segunda fase se optimizaron las condiciones experimentales para la obtención del jugo clarificado (permeado) de arazá, mediante el proceso de microfiltración tangencial (MFT).

El rendimiento de la pared celular bruta (PCB) fue del 1,24 % con relación a la pulpa de arazá y, 94,05 % de la pared celular purificada (PCP) con relación a la PCB; la caracterización química de la PCP fue de 11,18 % hemicelulosa, 24,55 % celulosa, lignina con 17,94 %, pectina insoluble en agua 23,64 %, cenizas 3,28 %, almidón 3,49 % y proteína 15,92 %. El rendimiento de la pectina soluble en agua (PSA) en la PCB fue de 5,95 % y tiene un grado de esterificación del 41,63 %.

El cóctel enzimático seleccionado fue la Rapidase TF, producto de la relación entre la composición de la pared celular obtenida y las actividades enzimáticas de siete preparaciones comerciales, que se confirmó con los ensayos realizados a condiciones fijas de concentración, tiempo y temperatura. Para este cóctel comercial se seleccionó el tratamiento con 200 ppm, durante 60 minutos a 40° C, que produjo un 30,56 % de SIS y 42,68 % de solubilización de la pulpa de arazá.

La optimización de las condiciones en el módulo MFT, con una membrana de cerámica Membralox® P19-40 en alfa-alumina de 0,5 μm , se realizó en modo recirculación y en continuo, en el que se consiguió un flujo del permeado por área de la membrana (J_p) de 175 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, con un factor de reducción volumétrico (FRV) de 5,39 y una presión transmembranaria (PTM) de 3 bar.

Se obtuvo el 90,71 % de rendimiento de jugo clarificado a pulpa refinada de arazá, con relación al 75,83 % que se alcanzó en la pulpa sin refinar. Se considera que es una alternativa atractiva e innovadora para esta fruta.

INTRODUCCIÓN

Las frutas amazónicas fueron identificadas como una alternativa productiva desde mediados de la década de los años 80, en la cuenca amazónica. Frutas tales como el arazá (*Eugenia stipitata*), son parte de la oferta de la gran diversidad presente en la región amazónica y han ganado un nicho de mercado en la última década, pues en el contexto mundial el mercado de productos exóticos (frescos y procesados) ha crecido continuamente. El cultivo de arazá cuenta con 704 ha de superficie plantada a nivel nacional y aproximadamente 250 ha producidas de forma silvestre y en sistemas agroforestales en las provincias del oriente (INEC *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2007).

Esta fruta despierta un considerable interés agroindustrial por las cualidades organolépticas del fruto y por la productividad de la planta. Posee una actividad antioxidante que es importante desde el punto de vista funcional, ya que interviene en la prevención de enfermedades cardio-vasculares y ciertos tipos de cáncer (INIAP/SENACYT, 2009; Kaur y Kapoor, 2001).

Su alto contenido de humedad contribuye al incremento de la tasa respiratoria e incide directamente en la alta perecibilidad. El contenido proteico del 12 % en base seca resulta moderadamente alto y puede estar asociado a una alta tasa metabólica, con un importante nivel de actividad enzimática. El transporte del fruto para el comercio en fresco es extremadamente difícil debido a que es altamente sensible a la pudrición. El fruto de arazá es bastante delicado, se ablanda con facilidad, por lo que es importante el procesamiento de la fruta en forma de pulpa, lo más rápido posible, para luego guardarla congelada o refrigerada hasta el momento de su comercialización o para utilizarla en la obtención de otros productos y de esta manera conservar sus cualidades organolépticas (Ferreira y Gentil, 1999; Hernández *et al.*, 2006).

En función de su aroma, sabor y, principalmente del alto rendimiento en pulpa, lo consideran ideal para combinar el jugo con otras frutas y de esta forma mejorar la acidez natural que tiene esta fruta. La industria alimentaria se ha interesado

siempre en incorporar nuevas tecnologías en la producción y conservación de alimentos con el objeto de aumentar la higiene, seguridad y vida útil, para mantener un sabor natural. Es aquí, donde la MFT cuyo principio se basa en la separación física, donde el tamaño del poro de la membrana determina el punto en que son retenidos los sólidos disueltos, la turbidez y los microorganismos, además interviene directamente en la obtención de un jugo inocuo, sin residuos químicos y lo que es más importante un producto fresco y natural. En este proceso los sólidos responsables de la colmatación rápida de las membranas son principalmente los polisacáridos provenientes de la pared celular de las frutas. El pre tratamiento enzimático con enzimas hidrolíticas, es una de las alternativas en la obtención de los jugos clarificados (Ferreira y Gentil, 1999; Vaillant *et al.*, 1999; Binetti *et al.*, 2004; Lenntech, 2008).

En esta investigación se pretende elevar el nivel de los ejes de valor que determinan el éxito de un producto agrícola en el mercado, que son: inocuidad, sensorial, conveniencia, funcional y ética. Es así como podrán desarrollarse varios campos a plenitud, pues proporciona la información necesaria para la utilización de tecnologías como la enzimática y membranaria que permitan obtener productos innovadores de acuerdo con las tendencias actuales del mercado y de gran aporte para el crecimiento y desarrollo para el sector manufacturero de la región amazónica con el propósito de mejorar el nivel de vida de muchas personas, que dependen de la producción de estos frutales amazónicos, con la agregación de valor.

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron las siguientes actividades: Se extrajo, purificó y caracterizó la pared celular del arazá. Se seleccionó el cóctel comercial que presentó los mejores resultados para solubilizar la pulpa congelada de arazá, a partir de la composición de la pared celular y de las principales actividades enzimáticas de algunas preparaciones comerciales. Se optimizaron las condiciones de trabajo en la microfiltración tangencial para la obtención de los mejores rendimientos del jugo clarificado de arazá.

ABREVIATURAS

A.O.A.C.:	Association of Official Agricultural Chemist
ATP:	Adenosín Trifosfato
BC:	Bomba de recirculación
BE:	Bomba de alimentación
C:	Cromaticidad
cm:	Centímetro
CORPEI:	Corporación de Promoción de Exportaciones
Cp:	Centipoise
cSt:	Centistokes
FRV:	Factor de reducción volumétrica
IIAP:	Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana
INEC:	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
INIAP:	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
Jp:	Flujo del permeado por unidad de área de la membrana
MFT:	Microfiltración tangencial
MIAA:	Materia insoluble en alcohol y agua
ml:	Mililitros
mm:	Milímetro
MPa:	Mega Pascales
NF:	Nanofiltración
NTU:	Nefelometric Turbidity Unit
OI:	Ósmosis Inversa
MIA:	Pared celular bruta
ppm:	Partes por millón
PSA:	Pectina soluble en agua
PTM:	Presión transmembranaria
RPM:	Revolución por minuto
SIS:	Sólidos Insolubles en Suspensión
UF:	Ultrafiltración

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 ARAZÁ (*Eugenia stipitata*)

En la figura 1 se puede observar el fruto de arazá en su estado natural.



Figura 1. Fruto de arazá
(Vignale y Mezzera, 2009)

1.1.1 ORIGEN Y CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

El arazá es originario de la región amazónica occidental, comprendida entre los ríos Marañón y Ucayali, en las proximidades de Requena y el nacimiento del río Amazonas. Su origen corresponde a uno de los cinco centros de diversidad que se encuentran en la Amazonía. La mayor diversidad genética de *Eugenia stipitata* se registra en el sudoeste de la Amazonía, de igual manera, la especie se encuentra en estado silvestre solamente en la Amazonía Occidental (Hernández *et al.*, 2006; Quevedo, 1995).

Se cree que los amerindios semi-domesticaron y mejoraron muchas especies vegetales en la Amazonía, dentro de las cuales posiblemente se encuentre la

Eugenia stipitata. La selección inicial se realizó en algún lugar del área de origen de esta subespecie y a partir de ejemplares semi-domesticados se difundieron a otras zonas de la Amazonía Occidental. En la actualidad, el arazá es cultivado en Perú, Brasil, Ecuador, Colombia, Bolivia y Costa Rica (Ferreira y Gentil, 1999).

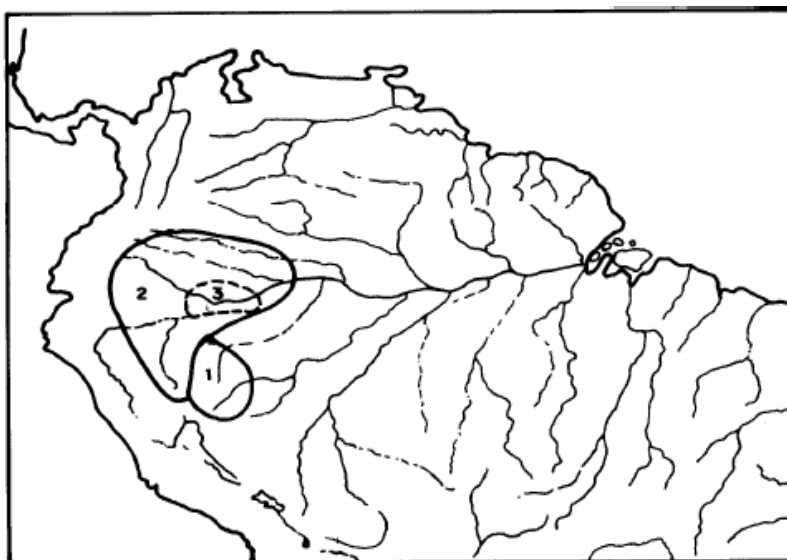


Figura 2. Área de origen de *Eugenia stipitata* subsp. *Stipitata* (1), subsp. *Sororia* (2) y raza (3) (Hernández *et al.*, 2006).

Según, Hernández *et al.*, 2006, la clasificación taxonómica del arazá es la siguiente:

Reino Vegetal:	(Plantae)
Subreino:	Embryophyta
División:	Tracheophyta
Subdivisión:	Spermopsida
Clase:	Angiospermae
Subclase:	Dicotyledoneae
Orden:	Myrtaceae
Familia:	Myrtaceae
Género:	<i>Eugenia</i>
Especie:	<i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh
Subespecie:	<i>Eugenia stipitata</i> subsp. <i>sosoria</i> <i>Eugenia stipitata</i> subsp. <i>stipitata</i>

1.1.2 MORFOLOGÍA GENERAL

El arazá es un árbol pequeño que alcanza 3 m de altura. La ramificación se inicia desde la base, con ramas de sección circular, glabras y lisas. Las hojas son sésiles, opuestas, de forma elíptica con ápice acuminado, lámina lisa o ligeramente pubescente con nervaduras que no sobresalen en el haz; pero, sí en el envés. La dimensión de las hojas varía entre 8 y 12 cm de largo por 3 a 6 cm de ancho (IIAP, 1997)

Las flores se encuentran tanto solitarias como agrupadas en racimos axilares de hasta cuatro unidades. Tiene cuatro sépalos verde amarillento, cuatro pétalos blancos y alrededor de 100 estambres libres. El ovario es inferior al receptáculo y tiene una polinización entomófila (Villachica *et al.*, 1996).

El fruto de arazá es una baya esférica, achatada, con diámetro longitudinal de 7 cm y diámetro transversal hasta de 12 cm, que le confiere una apariencia globosa, cóncava o esférica. El peso de los frutos puede oscilar entre 100 y 350 g. El epicarpio es delgado, menos de 1 mm de espesor. La pubescencia es fina y el color es verde claro, en la madurez fisiológica, y amarillo intenso, cuando se encuentra en madurez de consumo. El número de semillas en el fruto es variable, al igual que su tamaño. En el primer caso, el número va de 3 hasta 22 y el diámetro puede ir de 1 a 6 cm (Barrera y Hernández, 2004).

1.1.3 MANEJO AGRONÓMICO DEL CULTIVO

1.1.3.1 Requerimientos del cultivo

Los requerimientos para el cultivo de arazá son los siguientes (PROEXANT, 2007):

Clima:	Trópico, sub-trópico y cálido
Temperatura:	21 – 24°C
Humedad:	> 60 %

Pluviosidad:	2 000 – 3 500 mm/año
Altitud:	Nivel de mar, hasta los 600 m
Vientos:	Menores de 30 km/h
Formación ecológica:	Bosque húmedo y bosque muy húmedo tropical, bosque pluvial tropical
Textura:	Francos, con una profundidad de por lo menos 50 cm
Acidez:	5,2 a 6,8
Tipo de suelo:	Bien drenados, profundos, ricos en materia orgánica y potasio, topografía ligeramente plana

1.1.3.2 Métodos de propagación

La propagación se realiza principalmente por semillas, extraídas de los frutos completamente maduros, ya que es el estado en que las semillas presentan el mayor poder germinativo. Después de la cosecha manual de los frutos, las semillas pueden ser extraídas manualmente o mecánicamente, según su cantidad, y también pueden ser mantenidas en el propio fruto, al medio ambiente por hasta 5 días, sin que pierdan su poder germinativo. Las mismas que deben provenir de plantas con alta productividad y de frutos sanos, luego se procede a lavarlas y desinfectarlas con fungicidas, con el fin de evitar contaminaciones y pudriciones durante la etapa de secado, que se realiza preferentemente en sombra (Gentil y Ferreira, 1997).

La germinación de las semillas es lenta y no uniforme, puede tardar entre 45 y 90 días para iniciar y 180 a 270 días para terminar el proceso. Por último, se procede inmediatamente a sembrar con el fin de mantener la viabilidad de las semillas. Pasados los 8 días después de extraída, la semilla, pierde considerablemente su poder germinativo (AGRONET, 1997).

Cuando las plántulas tienen 10 cm son colocadas en bolsas que contienen 2 kg de tierra o en camas de almáciga de 1,2 m de ancho por 10 m de largo. Por su parte, las semillas germinadas en bolsas de plástico deben ser repicadas cuando la plántula tenga 1 cm. En el vivero, las plantas se manejan de acuerdo con las

prácticas normales de la fruticultura, hasta los nueve meses, cuando ya pueden ser trasplantadas a campo definitivo. En caso de hacerse el vivero en camas, este debe estar muy cerca del sitio donde se instalará en forma definitiva la plantación; para lograr un mejor prendimiento, el trasplante debe efectuarse con tierra alrededor de la planta (IIAP, 1997).

1.1.3.3 Prácticas culturales y producción

El trasplante debe efectuarse cuando las lluvias estén bien definidas y el distanciamiento a utilizarse puede ser inicialmente de 3 m por 3 m; para luego, con el crecimiento y desarrollo de la plantación, llegar a un distanciamiento definitivo de 6 m por 6 m. Esta propuesta se hace en razón que el arazá empieza a producir frutos a los 12 meses del trasplante, cuando cada planta produce entre 20 y 35 kg al año. Además. Se recomienda que las plantas tengan una poda de formación en el vivero, así como, en el campo definitivo, la formación de tres a cuatro ramas gruesas. De igual manera, deben recibir las podas anuales de limpieza propias de todo árbol frutal (Barrera y Hernández, 2004; IIAP, 1997).

El abonamiento responde a un alto contenido de nitrógeno y fósforo, cuando el arazá es cultivado en suelos ácidos de baja fertilidad. Durante el primer año, este frutal se puede asociar con cultivos anuales como la yuca y el caupí, que en algunos casos se puede repetir en el segundo año. La asociación con otros cultivos permanentes solo se recomienda en el caso que se piense en el arazá como el cultivo transitorio, para dejar la otra especie como la plantación permanente, en el que se puede aprovechar la ventaja del rápido desarrollo y precocidad en producir frutos (Barrera y Hernández, 2004; Ferreira y Gentil, 1999).

1.1.3.4 Principales plagas y enfermedades

A continuación, en las tablas 1 y 2, se presentan las principales plagas y enfermedades que afectan al cultivo de arazá, respectivamente.

Tabla 1. Principales plagas que afectan al cultivo de arazá

Nombre	Consecuencias	Control
Mosca de la fruta (<i>Anastrepha striata</i>)	Las larvas de la mosca nacen, se desarrollan en el interior de la fruta y se alimentan de la pulpa.	Con aspersiones de insecticidas, se debe eliminar los frutos caídos
Ácaro de los cogollos (<i>Tegunutes guabae</i>)	Es una araña pequeña, que ataca a los cogollos tiernos, en el absorbe la savia e inocula la toxina causante de la toxemia, por lo produce puntos amarillos y deformación en las hojas.	Kelthane, como fungicida y acaricida
Gusano negro (<i>Mimallo amilia</i>)	Las larvas son negras, presentan pelos negros en el dorso y con sus propios excrementos, en la base de las hojas fabrican una cápsula café oscura en la que viven y se desarrollan hasta convertirse en pupas y mariposas, en el estado larvario se alimentan del follaje de los arbustos.	Mediante insecticidas o mediante control biológico con un tipo de avispa.

* PROEXANT, 2005

Tabla 2. Principales enfermedades que afectan a la planta de arazá

Nombre	Consecuencias	Control
Antracnosis (<i>Glomerella singulata</i> , <i>Colletotrichum gloesporoides</i>)	Al principio se aprecian manchas amarillentas en las flores, luego en las frutas, las que se van ennegrecen hasta que la fruta cae al suelo o queda momificada en la rama.	Mediante aspersiones de fungicidas a base de cobre.
Roñas o costras del fruto (<i>P. Vesicular gen. Pastalotia</i>)	En las hojas causan deformaciones y las flores infectadas producen frutos deformes, si atacan al fruto, detienen su desarrollo, lo endurecen y toman un aspecto corchoso, en ocasiones se cubren de costras de color pardo.	Evitar el exceso de humedad, debe ser controlado con rapidez ya que su ataque es muy severo, se controla mediante aplicación preventiva de insecticida cada 4 meses.
Fumagina (<i>Capnodium sp.</i>)	Polvillo negro que cubre las hojas, ramas y tronco, afecta la fotosíntesis, respiración y transpiración, retarda el crecimiento.	Eliminación de vectores como mosca blanca, áfidos, coccidios. Poda de arbustos y eliminación de malezas.

* PROEXANT, 2005

1.1.3.5 Tecnología de cosecha y postcosecha

La cosecha en plantas adultas se da todo el año. La planta tiene simultáneamente flores y frutas, aunque existen períodos de mayor cosecha, como los meses de octubre a enero y de abril a junio (IIAP, 1997).

La fruta es susceptible a sufrir daño por el manipuleo y transporte, especialmente cuando está madura, por lo que la cosecha se debe realizar cuando la fruta aún está casi verde, denominado estado pintón, por esta razón, es muy difícil el comercio en fresco. El fruta continúa el proceso fisiológico y madura después de cosechado, pero cosechado completamente maduro es más aromático. Una vez cosechado debe colocarse en cajas rígidas y resistentes con menos de tres hileras de frutos cada una y debe transportarse con mucho cuidado, para evitar el aplastamiento. En los mercados y ferias o para la industria, la oferta de frutos, en buenas condiciones dependerá también de la duración del transporte y de las condiciones de los caminos (Ferreira y Gentil, 1999).

Los frutos que se mantienen a temperatura ambiente pierden el 2, 8, 16 y 23 % del peso en el tercero, cuarto, quinto y sexto día, respectivamente. Si la fruta presenta lesiones o se cosechó semi-maduro, la disminución del peso es mayor (Villachica *et al.*, 1996).

La fruta de arazá es bastante delicada, se ablanda con facilidad y se recomienda que sea procesado en forma de pulpa lo más rápido posible, para luego conservarla congelada o refrigerada hasta el momento de su comercialización o para ser utilizada en la obtención de otros productos. La fruta fresca puede guardarse en refrigeración, a 8 - 10° C, con menores pérdidas de peso. Por otro lado, la pulpa puede almacenarse congelada a -10° C (IIAP, 1997; Ferreira y Gentil, 1999).

1.1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición de la pulpa de arazá se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Composición química del arazá

Análisis	Fruta de arazá
Humedad (%)	95,12
Cenizas (%)	0,14
Extracto etéreo (%)	0,04
Proteína (%)	0,71

Continuación tabla 3.

Fibra cruda (%)	0,37	
Carbohidratos totales (%)	3,62	
pH	2,79	
Acidez titulable (% ácido málico)	2,79	
Sólidos solubles (° Brix)	4,40	
Azúcar total (%)	1,89	
Vitamina A (UI/100 g)	150,21	
Vitamina C (mg/100 g)	36,84	
Polifenoles totales (mg/100 g)	121,16	
Carotenoides totales (mg/100 g)	0,27	
Antocianinas (mg/100 g)	0,04	
Actividad antioxidante (μ mol equivalente trolox/g)	5,00	
Minerales	Calcio (μ g/g)	100,00
	Magnesio (μ g/g)	47,00
	Potasio (μ g/g)	500,00
	Fósforo (μ g/g)	100,00
	Sodio (μ g/g)	9,00
	Hierro (μ g/g)	1,00
	Zinc (μ g/g)	2,00
	Selenio (μ g/kg)	0,02
	Cadmio (μ g/kg)	4,00
	Plomo (μ g/kg)	40,00

* INIAP/SENACYT, 2009

1.1.5 PRODUCCIÓN Y USOS

El comercio de frutas de arazá se presenta básicamente en los mayores centros urbanos de la Amazonia Occidental. La información sobre la producción y el consumo de arazá en Ecuador adolece de confiabilidad y actualidad. Aparentemente los frutales tropicales promisorios, como el arazá, tienen alguna importancia en los mercados regionales y muchos de ellos no son conocidos por los consumidores de los principales centros urbanos del país, ni de las regiones en donde se cultivan. Por tal motivo, no aparecen en las estadísticas del subsector frutícola. Por otra parte, los países productores de esta fruta son todos aquellos pertenecientes a la cuenca amazónica, donde existe en forma silvestre o en pequeñas plantaciones (Hernández *et al.*, 2006).

Según la información entregada por el MAG, en el último Censo Agropecuario del Ecuador, registró que el cultivo de arazá cuenta con 704 ha de superficie plantada a nivel nacional y aproximadamente 250 ha producida de forma silvestre y en

sistemas agroforestales en las provincias de Orellana, Sucumbíos, Napo, Pastaza y Morona; es importante destacar que no existe la información necesaria para la determinación de proyecciones o tendencias de producción y superficie para el presente año (INEC *et al.*, 2002).

Las zonas de producción en la región amazónica son: en el norte (Cascales, Lago Agrio, Shushufindi, Sacha, Coca, Loreto), en el centro (Archidona, Tena, Mera, Puyo, Palora, Macas, Sucúa, Logroño, Méndez, Gualaquiza) y en el sur (Yantzaza, El Bangui, Nangaritza, Centinela del Cóndor), las mismas que están repartidas durante todo el año; sin embargo, el pico de producción en la región norte se registra entre febrero y mayo, y de agosto a noviembre. En las regiones centro y sur se presentan fluctuaciones de producción de entre 3 y 6 meses, que depende de la zona, a excepción de los cantones de Nangaritza y Centinela del Cóndor que registran un solo pico de producción comprendido en mayo (CORPEI, 2005).

Esta fruta, por lo general, no se consume directamente en fresco, por causa de su elevada acidez. Por esta razón, en diversas regiones pertenecientes a la cuenca amazónica, se identifican numerosas aplicaciones agroindustriales del fruto para la elaboración de pulpas, mermeladas, bocadillos, néctares, cócteles, vinos, conservas y deshidratados de buena calidad y estabilidad, también es ideal para combinar con jugos de otras frutas, por su alto rendimiento de pulpa (alrededor del 60 %), así como su utilización en la industria de perfumes, por su alto potencial para la extracción de sus principios aromáticos debido a su agradable y exótico olor. Además, se exalta su valor nutritivo por su contenido de vitamina C (Hernández *et al.*, 2006).

1.2 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

1.2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LAS ENZIMAS

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Estas biomoléculas se encuentran en las células y en los organismos.

Son excelentes catalizadores, digieren y regulan miles de reacciones celulares al mantener la transformación de energía, la síntesis y la degradación metabólica (Boyer, 2000; Lehninger, 1981).

Las reacciones catalizadas por enzimas, también, se verifican en muchos alimentos e influyen positiva o negativamente sobre su calidad. Las propiedades de las enzimas son aprovechadas en mayor magnitud, debido a la gran cantidad de preparados enzimáticos que se utilizan, tanto para el análisis de los componentes de los alimentos, como para la preparación industrial de los mismos (Belitz y Grosch, 1997)

1.2.1.1 Cofactores enzimáticos

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura proteica, mientras que, otras necesitan de uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ion metálico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima; algunas enzimas necesitan de ambas. Los cofactores son generalmente estables frente al calor, a diferencia, de muchas proteínas enzimáticas que pierden su actividad (Lehninger, 1981).

1.2.1.2 Principios de la catálisis y acción enzimática

Cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. En una reacción catalizada, la sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato, el cual se une a una región concreta de la enzima, llamada centro activo, que comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico (Reed, 1975).

La característica más sobresaliente de las enzimas es su elevada especificidad, que se divide en: *especificidad de sustrato*, que es la molécula sobre la que la enzima ejerce su acción catalítica, y la *especificidad de acción*, que representa la acción catalizadora en cada reacción por una enzima específica. La acción

enzimática se caracteriza por la formación de un complejo, en el cual, el sustrato se une a la enzima a través de numerosas interacciones (Belitz y Grosch, 1997).

1.2.1.3 Función de las enzimas

Una reacción química, como $A \rightarrow P$, tiene lugar porque cierta fracción de las moléculas A , en cualquier instante dado, posee la suficiente energía (de activación) como para alcanzar un estado activo, llamado estado de transición, donde es muy elevada la probabilidad de que se establezca o se rompa un enlace químico para formar el producto P (Lehninger, 1981).

La velocidad de reacción depende del número de moléculas de sustrato que alcanzan el estado de transición, por unidad de tiempo. Existen dos formas de aumentar la velocidad de reacción; al elevar la temperatura para incrementar el movimiento térmico y el nivel de energía de las moléculas; y, al acelerar la velocidad de la reacción, con la disminución de la energía de activación, a través de un catalizador (Yrwin, 1997; Valeri, 2006).

Las propiedades catalíticas de las enzimas se relacionan con las siguientes características: al aumentar la velocidad de una reacción disminuye la barrera de activación, no se produce ningún consumo ni cambio permanente de la estructura durante el proceso catalítico y no se altera la posición de equilibrio de la reacción (Lehninger, 1981).

1.2.1.4 Regulación de las reacciones enzimáticas

Existen factores que regulan la cinética de las reacciones enzimáticas, como la concentración de la enzima y el sustrato, el pH de la solución de reacción y la temperatura. Al añadir más enzima (catalizador), la velocidad inicial de reacción deberá ser mayor cuanto mayor sea la concentración de la enzima, siempre y cuando haya la suficiente cantidad de sustrato; por consiguiente, existe una relación lineal entre la velocidad de la reacción y la concentración de la enzima,

luego la curva de la reacción asume una forma hiperbólica, cuando todas las moléculas de enzima están saturadas de sustrato (Boyer, 2000; Reed, 1975).

La mayoría de las enzimas posee un pH característico en el que su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese valor, la actividad disminuye y varía de una enzima a otra, valores extremos pueden causar una desnaturalización proteica considerable y la consecuente inactivación. Caso similar puede presentarse con la temperatura (Valeri, 2006; Lehninger, 1981).

1.2.1.5 Clasificación general de las enzimas

Las enzimas se clasifican dentro de seis categorías, como se indica en la tabla 4 (Boyer, 2000).

Tabla 4. Clasificación y función de las enzimas

Número de clasificación	Clase de enzima	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones, casi siempre en forma de iones hidruro o átomos de hidrógeno
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra
3	Hidrolasas	Ruptura de enlaces por hidrólisis
4	Liasas	Formación de dobles enlaces por eliminación de grupos o adición de grupos a un doble enlace
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de una misma molécula para dar formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N por condensación acoplada con la ruptura de ATP

* Boyer, 2000

1.2.2 CLASIFICACIÓN Y USOS DE LAS ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Las enzimas hidrolíticas aceleran las reacciones en las que una sustancia se rompe en componentes más simples, por reacción con moléculas de agua. Estas moléculas actúan mediante la ruptura o fraccionamiento de los sustratos por la hidrólisis (Arthey, 1997).

Las enzimas hidrolíticas pueden ser clasificadas en tres categorías, en función de su modo de acción, así se tienen las exo-enzimas, endo-enzimas (Marcelin, 1992; Olle, 1997).

Existen cuatro estados de degradación de los tejidos por las enzimas hidrolíticas, que corresponden a diferentes objetivos tecnológicos en el procesamiento de las frutas, los que se presentan a continuación: (Voragen, 1985; Marcelin, 1992)

- Maceración, que consiste en la separación de las células del tejido por lisis del cemento péctico intercelular. Estas células se mantienen en suspensión.
- Desintegración, que degrada parcialmente las paredes celulares y las sustancias pécticas.
- Licuefacción, donde el objetivo es disolver completamente las paredes celulares.
- Sacarificación, que consiste en inducir la licuefacción para obtener los azúcares simples, como los monosacáridos y disacáridos.

1.2.2.1 Las proteasas

Se clasifican dentro de las hidrolasas. Rompen los enlaces peptídicos de las proteínas y liberan grupos amino (NH_2) y carboxilo (COOH), originan polipéptidos de menor peso molecular y/o aminoácidos libres. Son específicas, es decir, hidrolizan moléculas de proteína en las uniones entre ciertos aminoácidos. Por otro lado, existen proteasas que no son específicas, en cuanto a la composición de aminoácidos y pueden hidrolizar a la proteína en varios fragmentos (Boyer, 2000).

Entre sus principales aplicaciones se encuentra la hidrólisis de la caseína para la fabricación de quesos, en la industria cervecera la hidrólisis de la proteína de la malta (complementación y/o sustitución de malta de cebada), solubilización de las proteínas para la levadura y para clarificar jugos mediante la hidrólisis de las proteínas de las pulpas como paso previo para el proceso de filtración membranaria (Valeri, 2006).

1.2.2.2 Alfa amilasa

En general, las amilasas se obtienen a partir de cultivos de bacterias y mohos. Es una endoenzima que hidroliza las uniones de almidón, glucógeno y glucanos; primero libera oligosacáridos, de 6 a 7 unidades de glucosa, y posteriormente azúcares reductores, como la maltosa (Boyer, 2000).

La α -amilasa se utiliza para la producción de jarabe de almidón y azúcares. En la panificación funciona como un complemento de la harina, asegura una cantidad suficiente de azúcares fermentables para la levadura; en la industria cervecera se utiliza para la sustitución y/o complementación de enzimas de malta, así como, en la producción de jugos de frutas que contienen alto contenido de almidón; como es el caso del maracuyá y la manzana (Belitz y Grosch, 1997).

1.2.2.3 Lactasa

Conocida también como β -*D*-galactosidasa, hidroliza la lactosa y forma glucosa y galactosa, monosacáridos que son considerados más dulces, digestivos y solubles a la lactosa. Se utiliza en la fabricación de yogurt, la adición de lactasa acelera el aumento de la acidez, aumenta el dulzor, la viscosidad y la vida en percha. En el caso de los quesos maduros, la suplementación con lactasa implica la reducción del tiempo de maduración y, consecuentemente, la reducción de los costos (Montes y Magaña, 2002).

1.2.2.4 Invertasa

Es una enzima que convierte la sacarosa en fructosa y glucosa. Se utiliza principalmente en la fabricación de jarabes, postres y miel artificial (Valeri, 2006).

1.2.2.5 Pectinasas

Por lo general, son las enzimas pectinolíticas, que corresponden a una mezcla de enzimas que actúan sobre los polisacáridos vegetales que mantienen la integridad

de la pared celular. En el procesamiento de los jugos de las frutas, el producto obtenido generalmente es viscoso y turbio, debido a la pectina disuelta y por los fragmentos de las paredes celulares, que se encuentran en suspensión. Cuando se agregan pectinasas, la viscosidad disminuye y las partículas pueden eliminarse fácilmente, mediante centrifugación o filtración (Millán, 2003).

1.2.2.6 Celulasas y hemicelulasas

Son las responsables de la descomposición de los polisacáridos glucosídicos, que están compuestos por fibras insolubles, como la celulosa y la hemicelulosa. Las celulasas fúngicas son usadas solas o con pectinasas, en el procesamiento de los jugos de fruta, en la fermentación de los alimentos, producción de vinos y en la fermentación alcohólica, en general (Montes y Magaña, 2002).

1.3 LA PARED CELULAR DE LAS FRUTAS

1.3.1 DEFINICIÓN

La pared celular de las frutas es una envoltura sólida, resistente y extensible, que rodea al plasma y cumple algunas funciones, como la de sostén mecánico, de control de intercambios intercelulares y de protección contra las infecciones microbianas. Está constituida fundamentalmente de polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, pectinas y la lignina, así como de proteínas, compuestos fenólicos, pigmentos, lípidos, vitaminas y minerales. Influye durante su transformación. (Roland, 1980).

1.3.2 DESCRIPCIÓN GENERAL

Constituye un sistema tampón entre el medio exterior y el contenido protoplasmático, que es un compartimiento permeable al agua y a los metabolitos auxiliares, del cual el citoplasma toma los elementos necesarios para su metabolismo y retorna componentes que ella elabora (secreciones y

desperdicios). Además, asegura la rigidez y la cohesión de las células en oposición a los choques osmóticos (Roland, 1980).

La pared celular vegetal evoluciona en función del grado de madurez de la célula y se distinguen tres niveles de organización: (Albersheim, 1978)

- **La laminilla media**, que se forma a partir de la mitosis, constituye el cemento intercelular que asegura la cohesión entre la célula. Está formada principalmente de pectinas.
- **La pared primaria**, está constituida por células meristemáticas, en proceso de crecimiento. Es una estructura bastante hidratada constituida de una trama suelta de micro fibrillas de celulosa intercaladas en una matriz amorfa compuesta de sustancias pécticas, hemicelulosa y proteínas; es decir, está formada esencialmente de polisacáridos (alrededor del 90 %) y de proteínas (alrededor del 10 %).
- **La pared secundaria**, es una estructura inextensible, rígida y débilmente hidratada (20 % o menos de agua). Está constituida de micro fibrillas de celulosa cristalina arregladas en estratos concéntricos, dispuestos paralelamente entre ellas y de diversas hemicelulosas. La orientación de las fibrillas de celulosa, con relación al eje de la célula, es variable de un estrato a otro, lo que conduce a distinguir habitualmente tres regiones visibles a la luz polarizada.

1.3.3 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

La pared celular de los vegetales está constituida, esencialmente por polisacáridos y lignina, una pequeña cantidad de proteínas (proteínas de estructura y enzimas), compuestos fenólicos, pigmentos, lípidos y minerales (Aspinall, 1980).

Los polisacáridos que forman parte de la pared celular pueden ser homo o heteropolímeros, constituidos por encadenamientos lineales o ramificados de

azúcares neutros de seis átomos de carbono (hexosas o metil-pentosas), de cinco átomos de carbono (pentosas) y azúcares ácidos de seis átomos de carbono (ácidos urónicos), como muestra en la figura 3 (Aspinall, 1980).

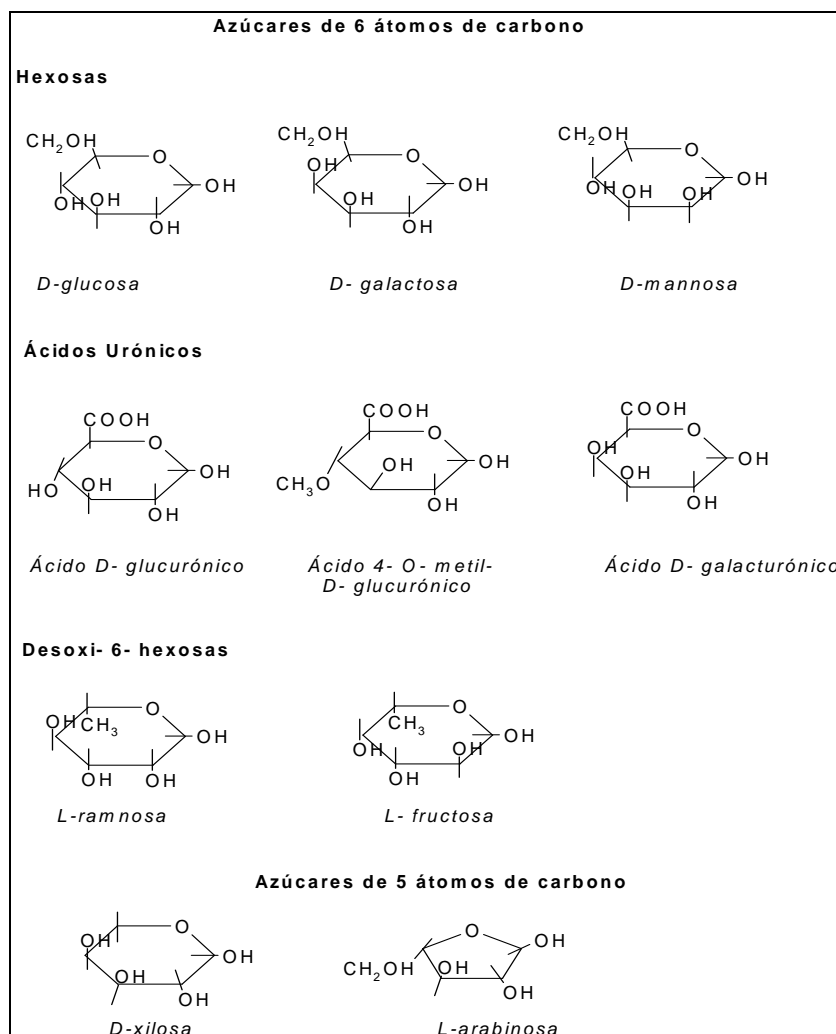


Figura 3. Azúcares componentes de los polisacáridos insolubles de la pared celular (Aspinall, 1980)

1.3.3.1 Lignina

La lignina está formada por polímeros tridimensionales que provienen de la copolimerización de tres alcoholes derivados del alcohol fenil propenoico: el alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sináfilico; la polimerización de estos alcoholes se realiza por condensación oxidativa (formación de enlaces C-C y C-O) entre unidades de fenil propano sustituidas (Olle, 1997).

Al ser un polímero amorfo tridimensional, su composición y propiedades difieren de las de los carbohidratos y las proteínas. La unidad estructural básica, más común, en la lignina es un fenilpropano, en el que uno o varios de sus carbonos tienen cualquiera de los siguientes grupos: $-\text{OH}$, $-\text{CH}_3$ y $-\text{C}=\text{O}$. La lignina se forma por condensación oxidativa (formación de enlaces C-C y C-O) entre dichas unidades de fenilpropano sustituidas. El polímero de lignina es, quizá, el más resistente a la degradación enzimática (Marcelin, 1992).

El proceso de lignificación en los vegetales se produce, al final del crecimiento de las células y no se realiza de manera uniforme, en las diferentes capas de la pared celular. Además, permite aumentar la resistencia mecánica de las paredes y disminuir la permeabilidad de los canales conductores (Marcelin, 1992).

1.3.3.2 Pectina

La pectina es el constituyente mayoritario de la lámina intermedia de los tejidos de las plantas y también se encuentran en la pared celular primaria. Incluyen una parte importante del material estructural de los tejidos blandos, como el parénquima de las frutas tiernas (Coulter, 1984).

Las pectinas se describen como polímeros lineales de ácido α -D-poligalacturónico, unidos por enlaces (1 \rightarrow 4), con una determinada proporción de sus grupos carboxilo esterificados con metanol, como muestra la figura 4. Sus pesos moleculares no se conocen con certeza, pero aproximadamente son de 100.000 (Coulter, 1984).

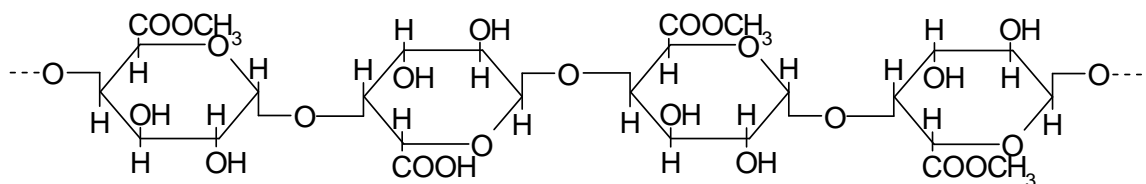


Figura 4. Estructura química de la Pectina
(Coulter, 1984)

La pectina es el principal componente enlazante de la pared celular de los vegetales y frutas soluble en agua. Tiene la habilidad de formar geles en medio ácido y en presencia de azúcares. Existen dos tipos de pectinas, las que tienen un alto grado de metilación, superior al 50 %, que forman geles irreversibles en medio ácido y en presencia de azúcares, éstas son utilizadas en la fabricación de confituras, gelatinas, etc.; y las pectinas débilmente metiladas, que son tecnológicamente importantes porque pueden formar geles termo reversibles, en presencia de ciertos iones metálicos divalentes, como el calcio (Vaillant *et al.*, 1998).

El grado de metilación está definido como la proporción de ácidos galacturónicos metil esterificados por cien ácidos galacturónicos totales, que permite clasificar las sustancias pécticas en tres categorías; conocidas como: ácido péctico, si el grado de metilación es inferior al 5 %; pectinas débilmente metiladas, si el grado de metilación es inferior a 50 %; y pectinas altamente metiladas, si el grado de metilación es superior al 50 % (Reed, 1975).

1.3.3.3 Celulosa

La celulosa es el polisacárido más difundido en la naturaleza. Este polímero es particularmente abundante en las paredes secundarias de los vegetales y representa del 20 al 30 % de la materia seca en la mayoría de las paredes primarias. Consta de moléculas lineales de un mínimo de 3.000 unidades de glucopiranosas, unidas por enlaces $\beta(1-4)$, las cuales se unen por enlaces de hidrógeno no intermoleculares para formar estructuras finas y largas llamadas microfibrillas, que son ordenadas de forma paralela en la celulosa nativa (Coulter, 1984; Reed, 1975).

La celulosa purificada contiene siempre cantidades menores de azúcares, diferente de la glucosa. Es posible que otros azúcares se integren en cadenas de β -glucanos y formen regiones para-cristalinas en las microfibrillas. Estos pueden también constituir impurezas tales como las hemicelulosas y una cierta cantidad de lignina durante la maduración de las frutas (Marcelin, 1992).

A continuación, en la figura 5, se presenta la estructura química de la celulosa.

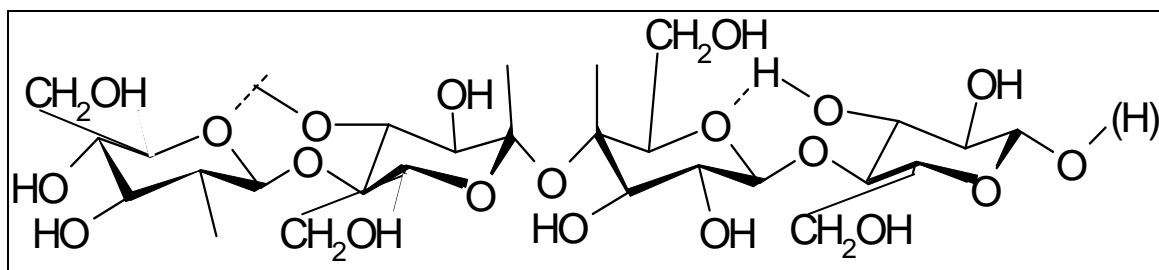


Figura 5. Estructura química de la celulosa
(Marcelin, 1992)

1.3.3.4 Hemicelulosa

Es una mezcla compleja de polisacáridos, cuya composición y frecuencia varía entre los tejidos, las especies vegetales y la etapa de desarrollo de la planta. Son un componente importante de la pared celular primaria y pueden constituir una cierta proporción de la lamela media y de la pared celular secundaria. Son precursores de bajo peso molecular (por lo tanto más solubles) de la celulosa (Coulate, 1984).

Los polímeros hemicelulósicos incluyen principalmente al xiloglucano, pero también glucomananos, galactomananos y arabinogalactanos. Las hemicelulosas se unen a los extremos de los polisacáridos pécticos y en varios puntos de las fibrillas de celulosa como se observa en la figura 6 (Olle, 1997).

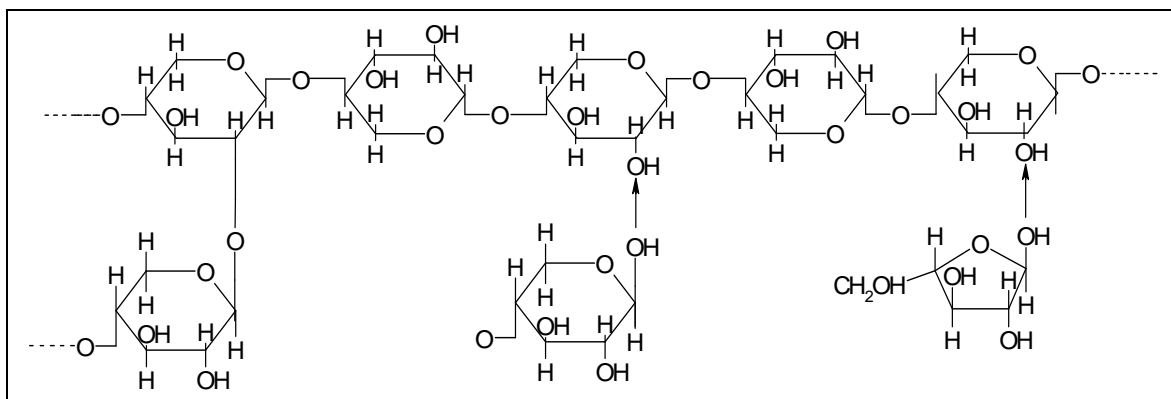


Figura 6. Estructura química de la hemicelulosa.
(Coulate, 1984)

1.3.3.5 Componentes menores

Las células vegetales contienen una gran variedad de proteínas, que funcionan como catalizadores de las reacciones que se efectúan en las células o como componente estructural de ellas (Marcelin, 1992).

El almidón, es el principal polisacárido de reserva que se encuentra en la célula vegetal, es un polímero de glucosa que existe en dos formas: la amilosa, una molécula esencialmente lineal y la amilopectina, una molécula muy ramificada que posee una cadena de mucha longitud (Marcelin, 1992).

Los taninos son un grupo heterogéneo de sustancias complejas polihidroxifenólicas. Son muy solubles en agua, donde dan reacción ácida por lo que se les denomina ácido tánico, ya que está compuesto mayoritariamente por ácido fenólico. También son solubles en alcohol, glicerina o acetona, insolubles en solventes apolares como éter, cloroformo, benceno, disulfuro de carbono. Los grupos fenólicos son los responsables de sus propiedades astringente y aséptica (Marcelin, 1992).

1.4 TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

La tecnología de membranas es un grupo de operaciones, en las que se emplean membranas semipermeables para la separación, concentración o fraccionamiento de partículas en solución. Esta tecnología, a nivel mundial, se encuentra en permanente evolución; continuamente se hallan más aplicaciones en la industria alimentaria y en la biotecnológica, así como, en el tratamiento de efluentes (Gekas, 1993; Cheryan, 1998).

Estos procesos constituyen un grupo de tecnologías limpias, de característica modular, con bajos requerimientos energéticos y con la funcionalidad de los productos a separar o concentrar; además, no requieren la aplicación de calor para efectuar los cambios de las fases y minimiza el riesgo de daño a los productos termolábiles (Cheryan, 1998).

1.4.1 PROCESOS DE SEPARACIÓN

En la tecnología de membranas la separación se basa, principalmente, en el tamaño molecular y en menor medida en la forma y la carga. Los cuatro principales procesos son la ósmosis inversa (hiperfiltración), nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración. Se pueden considerar como un espectro de procesos continuos, sin fronteras claras entre ellos. En la actualidad existe una variedad de membranas que cubre todo ese espectro. La figura 7 ilustra los rangos de separación de diversos procesos, con y sin membranas, con base en sus propiedades (Brennan, 2006).

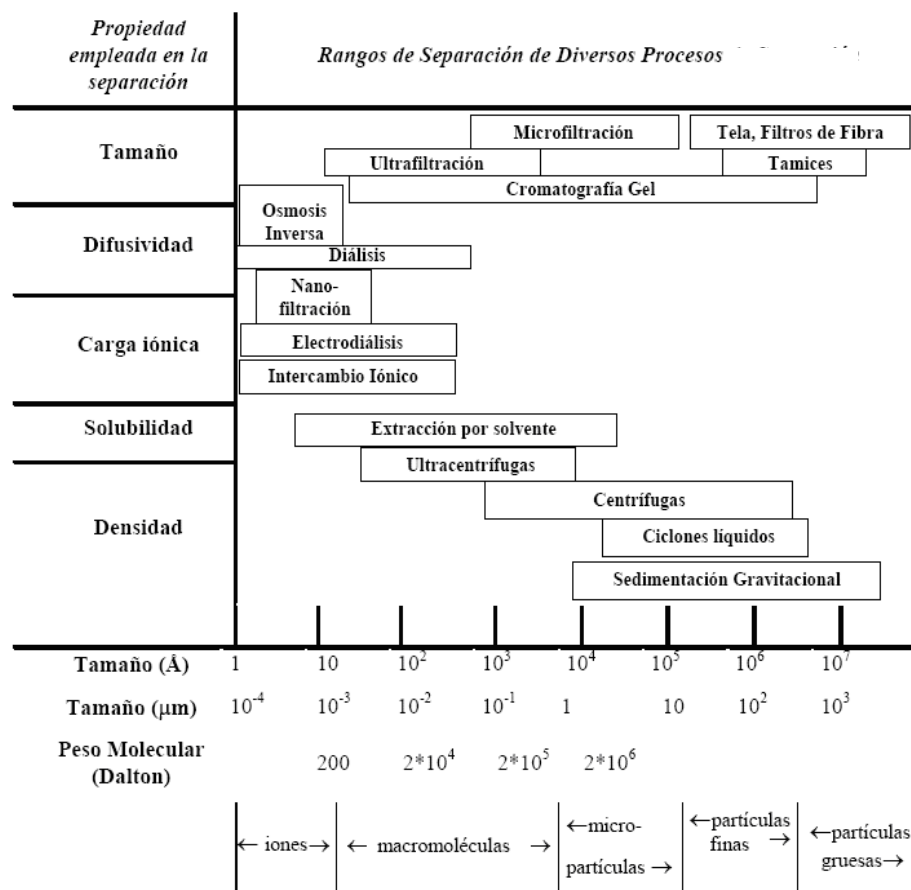


Figura 7. Rangos de separación de diversos procesos, con base en sus propiedades (Brennan, 2006)

La tecnología de membranas tiene muchas ventajas, comparada con otras técnicas de separación convencionales. Por ejemplo se puede realizar en

condiciones térmicas ambientales, sin aumentar la temperatura; por lo tanto, es adecuada para productos sensibles a procesos con calor, al mantener la calidad del producto. El costo de operación, mantenimiento y mano de obra es menor que en los procesos térmicos; se puede operar de forma continua y discontinua; además, permite la combinación con otros procesos (Mercé, 2005).

Una desventaja es el fouling o colmataje, que es el ensuciamiento de la membrana, con la consecuente disminución del flujo y el aumento del tiempo de filtración, que puede favorecer el crecimiento de microorganismos en la membrana, razón por la cual, requiere de una limpieza más frecuente, con el incremento del costo y del tiempo entre las filtraciones (Ollé, 1997).

1.4.2 PRINCIPIOS Y MODOS DE OPERACIÓN

1.4.2.1 Filtración

El principio básico de la separación, mediante el uso de membranas, está dado por la filtración, la misma que se define como la separación de dos o más componentes que se encuentran en un fluido, basada principalmente en la diferencia del tamaño. Su uso convencional se refiere a la separación de partículas sólidas inmiscibles en el líquido o en fluidos gaseosos (Cheryan, 1998).

El papel primario de una membrana es actuar como una barrera selectiva, que permita el paso de ciertos componentes y retenga otros componentes de una mezcla. Lo que implica que la fase retenida sea enriquecida en uno o más componentes (Schirg, 2001; Cheryan, 1998).

1.4.2.2 Operaciones de membranas

Los procesos membranarios constituyen una serie de técnicas de separación, que consisten en emplear un gradiente, ya sea de presión o electrostático, para forzar el paso de componentes de una disolución a través de una membrana porosa

semipermeable, para que se obtenga una separación sobre la base del tamaño e incluso de la carga molecular. Las operaciones de membranas pueden utilizarse para concentrar o purificar una solución o una suspensión y para fraccionar una mezcla (Chacón, 2006).

La figura 8 presenta un esquema de separación por membranas, donde la alimentación se aplica a uno de los lados y está sometida a una determinada presión. En la mayoría de los casos, la alimentación fluye en una dirección paralela a la superficie de la membrana, donde la corriente que pasa por efecto de la presión recibe el nombre de permeado (filtrado) y lo que no se filtró, recibe el nombre de retenido (Brennam, 2006).

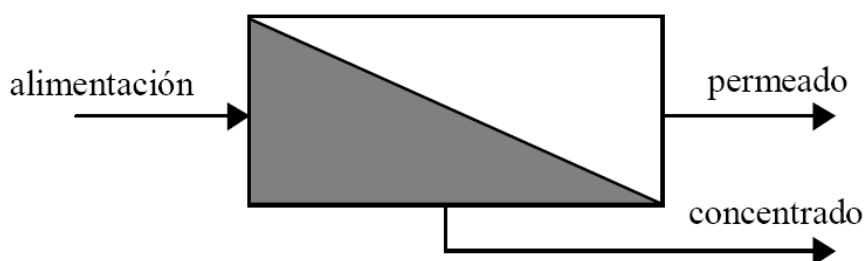


Figura 8. Esquema de separación por membranas.
(SAAVEDRA y ROMERO, s.f.)

La presión requerida para forzar el paso a través de la membrana suele ser proporcional al tamaño de los poros, donde es necesario incrementar sustancialmente su magnitud a medida que el tamaño de estos decrece (Cheryan, 1998; Chacón, 2006).

Los diferentes tipos de procesos para la separación, de acuerdo con el tamaño de las partículas y el rango de operación de la presión, se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Procesos de separación y sus características

Proceso de Separación	Rango de tamaño de la partícula separada (μm)	Rango de presión de operación (bar)	Retenido	Permeado
Microfiltración (MF)	0,1 - 10,0	0,1 - 5,0	Partículas	Disolventes, componentes con mas molecular pequeña.
Ultrafiltración (UF)	0,1 - 0,005	1,0 - 10,0	Partículas y macromoléculas	Disolventes, componentes con masa molecular pequeña, iones.
Nanofiltración (NF)	0,005 - 0,0005	10,0 - 50,0	Partículas, sustancias con masa molecular superior, iones polivalentes.	Disolventes, componentes con masa molecular muy pequeña, iones monovalentes.
Ósmosis inversa (Hiperfiltración) (OI)	< 0,0005	10,0 - 100,0	Partículas y todos los componentes con masa molecular superior.	Solamente disolventes (agua, metanol, etanol).

* Schirg, 2001

1.4.3 MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL

1.4.3.1 Concepto

La microfiltración tangencial (MFT) es una técnica de separación, que consiste en la filtración tangencial de una solución a través de una membrana, en función del tamaño de las partículas, las que son filtradas cuando su diámetro se encuentra entre el rango de 0,1 y 10,0 μm . Por remover la mayoría de las macropartículas, como es el caso de las bacterias, coloides, esporas, hongos, levaduras, etc., esta tecnología es considerada como una técnica de pasteurización en frío, que mantiene las propiedades organolépticas del producto (Huisman, 1998; Chacón, 2006; Ollé, 1997).

En la figura 9 se esquematiza un proceso de MFT.

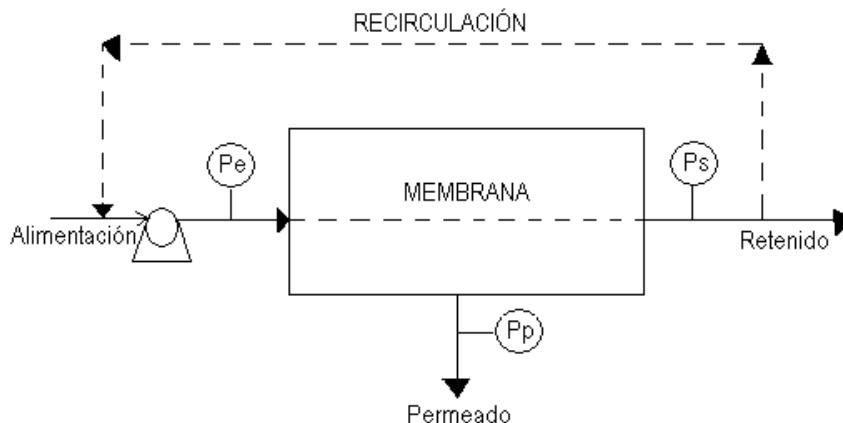


Figura 9. Esquema de un módulo de microfiltración tangencial (Cheryan, 1998)

Mediante la MFT se obtienen dos productos, el permeado y el retenido. El permeado es la fase de la alimentación que ha traspasado la membrana semipermeable y que se encuentra libre de microorganismos. El retenido es la fase de la alimentación que no traspasa la membrana semipermeable y que contiene una alta concentración de partículas. Esto sucede, debido a una diferencia de presión entre las dos fases (Huisman, 1998).

El proceso de filtración puede ser realizado bajo dos configuraciones diferentes, la perpendicular y la tangencial, como se muestra en la figura 10.

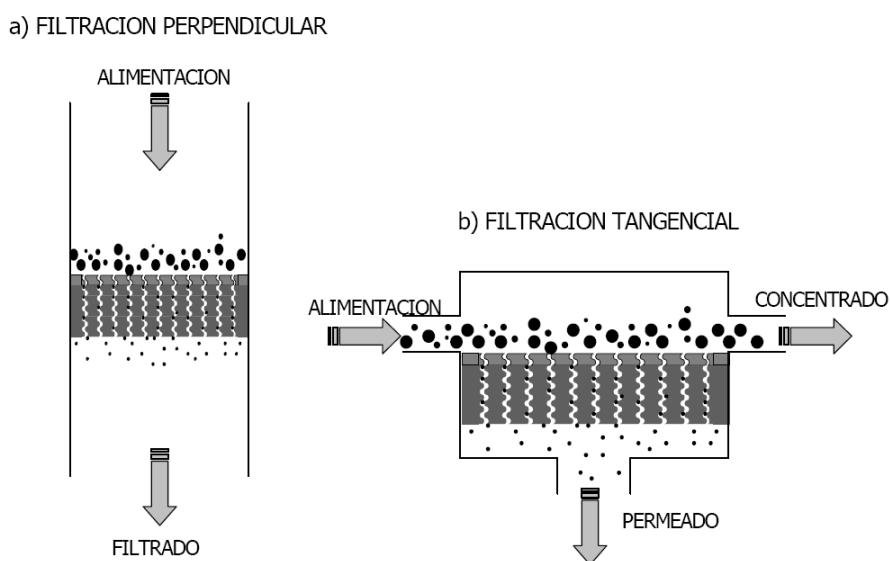


Figura 10. Tipos de Filtración (Saavedra y Romero, 1999)

En la filtración perpendicular las especies retenidas se acumulan en la interfase membrana-solución, en una capa cuya resistencia se opone a la fuerza impulsora (presión). En consecuencia, el flujo del permeado disminuye si la diferencia de presión se mantiene constante o causa el aumento de la diferencia de presión si el flujo del permeado se mantiene constante. Como resultado, el proceso de filtración frontal debe ser parado periódicamente para el lavado de la membrana (Saavedra y Romero, 1999).

La filtración tangencial ha intentado aliviar el inconveniente de la filtración perpendicular y se ha convertido en una opción viable a escala industrial, ya que gracias a este tipo de filtración, la alimentación líquida fluye paralelamente a la superficie de la membrana, lo que provoca que la misma alimentación barra continuamente la superficie del medio filtrante. Esta modalidad disminuye drásticamente el depósito e incrustación de solutos en la membrana. Como resultado, se produce un efectivo control del fenómeno de polarización por concentración, y un aumentando en la eficiencia de la separación. Esta técnica es más eficiente que el proceso tradicional de filtración perpendicular, lo que permite procesar mayores volúmenes de alimentación en forma continua o batch (Saavedra y Romero, 1999).

1.4.3.2 Parámetros de influencia en el proceso de MFT

Flujo de permeado (J_p). Es el volumen de permeado que pasa a través del área de la membrana por unidad de tiempo, también determina la capacidad del proceso de MFT (Huisman, 1998).

$$J_p = \frac{1}{A_m} \frac{dV}{dt} \quad [1]$$

Donde: A_m : área de membrana

V : volumen de permeado

t : tiempo

En la figura 11, se observa que durante el proceso de MFT la caída del flujo del permeado disminuye rápidamente, con el tiempo, hasta alcanzar la fase estacionaria. La disminución del flujo normalmente es atribuida a dos fenómenos: polarización de la concentración y el colmatage (Huisman, 1998).

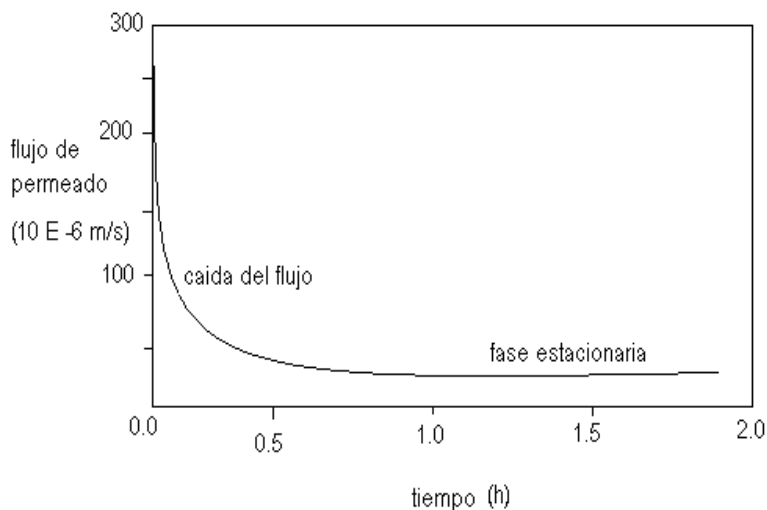


Figura 11. Comportamiento del flujo del permeado durante la microfiltración. (Huisman, 1998)

Presión transmembranaria (*PTM*). Es la fuerza motriz necesaria para el transporte de materia a través de la membrana. Se define como la diferencia de presión entre la presión de entrada al módulo y la de salida (Cheryan, 1998; Villareal, 1999).

$$PTM = \frac{Pe + Ps}{2} - Pf \quad [2]$$

Donde: *Pe*: Presión de entrada
Ps: Presión de salida
Pf: Presión de permeado

La presión del permeado se considera igual a la atmosférica, por lo tanto $Pf = 0$.

$$PTM = \frac{Pe + Ps}{2} \quad [3]$$

Según la Ley de Darcy, existe una relación entre la presión transmembranaria y el flujo, dado de la siguiente forma (HUISMAN, 1998).

$$PTM = \frac{PTM}{R_m \mu_o} \quad [4]$$

Donde: μ_o : Viscosidad del permeado

R_m : Resistencia hidráulica de la membrana en contra del flujo de permeado.

La Ley de Darcy plantea que el flujo de permeado es directamente proporcional a la presión transmembranaria. Sin embargo, al incrementar la presión, la polarización de la concentración y el colmataje aumentan debido al crecimiento de la concentración de las partículas cerca a la superficie de la membrana, lo que ocasiona un descenso en el flujo (Villareal, 1999).

Resistencia hidráulica total (R_t). Es la sumatoria de todas las resistencias al flujo presentes en la membrana. Como son la resistencia de la membrana (R_m), la resistencia causada por el taponamiento el poro (R_{tp}), la resistencia causada por la torta (R_f) en el fenómeno colmatage y la resistencia causada por la capa límite (R_{cl}) en la polarización de la concentración (Huisman, 1998).

$$R_t = R_m + R_{tp} + R_f + R_{cl} \quad [5]$$

Retención (ret). Es el factor que determina la calidad de separación de una membrana. La retención, ret , para una sustancia, está relacionada con la cantidad de dicha sustancia que no pasa por la membrana. Se define como la diferencia respecto a la unidad, de la razón entre las concentraciones del componente i en el permeado (C_{ip}) y en la alimentación (C_{if}) (Girard y Fukumoto, 2000).

$$ret = 1 - \frac{C_{ip}}{C_{if}} \quad [6]$$

Una membrana totalmente retentiva es la que retiene el 100 % de las partículas suspendidas y, por consiguiente, tiene una retención de 1.

Factor de reducción volumétrica (FRV). Se define en términos del volumen de alimentación (V_a), de retenido (V_r) y del permeado (V_p). Constituye un parámetro relacionado con el rendimiento del proceso (Chacón, 2006).

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} = \frac{V_r + V_p}{V_r} = 1 + \frac{V_p}{V_r} \quad [7]$$

Permeabilidad hidráulica (L_m). Es un factor propio de las membranas y se define como la capacidad de filtrar el solvente bajo una presión dada. Es el inverso de la resistencia de la membrana (Huisman, 1998).

$$L_m = \frac{1}{R_m} \quad [8]$$

Polarización de la concentración. Cuando se filtra una solución o una suspensión, la separación no tiene lugar en el seno de la solución, sino que lo hace en una pequeña región cercana a la membrana, conocida como capa límite. La polarización de la concentración ocurre si un componente es rechazado por la membrana. Como resultado, hay un aumento de la concentración de ese componente en la superficie de la membrana, junto con un gradiente de concentración sobre la capa límite (Huisman, 1998, Brennam, 2006).

Como se observa en la figura 12, el equilibrio dinámico se establece cuando el flujo convectivo, del componente a la superficie de la membrana, iguala al flujo de materia que se aleja de la membrana, ya sea en el permeado o de vuelta al seno de la solución por difusión, debido al gradiente de concentración establecido. Este aumento de la concentración, especialmente de componentes de peso molecular grande, añade una resistencia adicional significativa. También puede favorecer la formación de capas gelificadas o ensuciadas en la superficie de la membrana (Brennam, 2006).

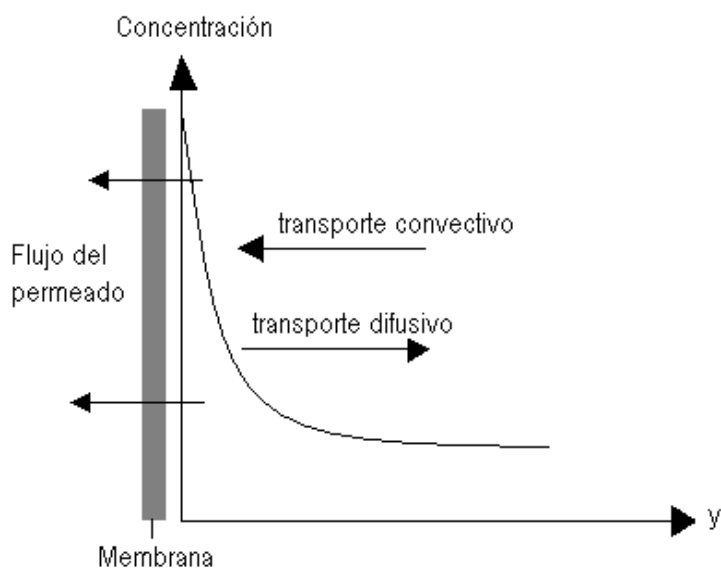


Figura 12. Representación de una capa de polarización de la concentración (Huisman, 1998)

Colmataje. Está influenciado por la hidrodinámica del proceso de filtración, por la interacción de la membrana y de la misma capa colmatada con los agentes, que se sedimentan por la morfología y la micro estructura interna de la membrana. A causa del colmataje, la membrana pierde selectividad. Existen muchas estrategias para reducir este efecto, por ejemplo, al realizar una adecuada selección de la membrana, se analizan las características de selectividad, estabilidad y facilidad de limpieza. También se debe regular el flujo, la velocidad y la presión aplicada (Girard, 2000; Chacón, 2000).

1.4.3.3 Membranas

Se puede considerar que es una barrera o película permoselectiva entre dos medios fluidos, que permite la transferencia de determinados componentes de un medio al otro, a través de ella, y evita o restringe el paso de otros componentes. El transporte de componentes a través de la membrana se realiza con la aplicación de una fuerza impulsora, que puede ser debida a gradientes de concentración, presión, temperatura o potencial eléctrico, como se puede ver en la figura 13 (Mercé, 2005).

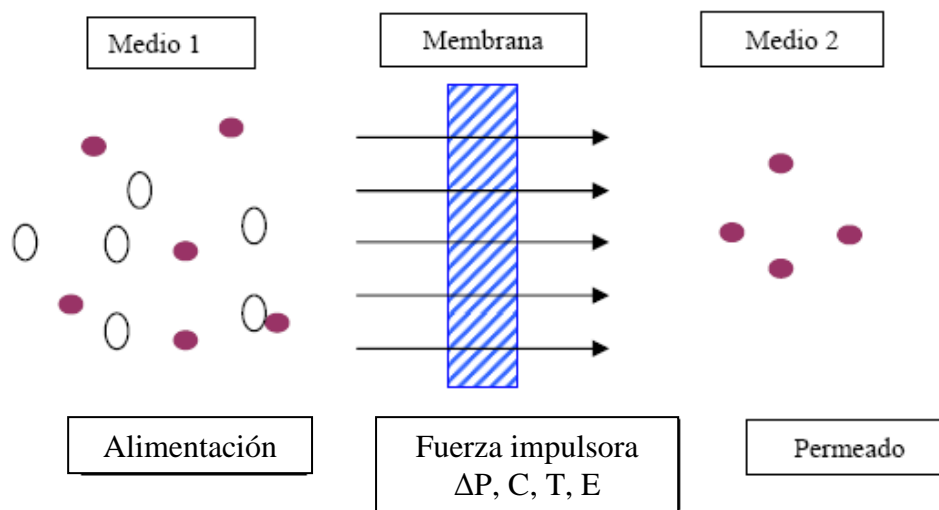


Figura 13. Representación esquemática de dos medios separados por una membrana
(Mercé, 2005)

La permeabilidad selectiva viene determinada por la medida de la partícula, la afinidad química con el material de la membrana y/o la movilidad de los componentes a través de la membrana (movimiento difusivo o convectivo). Las membranas, para ser efectivas en los procesos de separación y filtración, deben ser resistentes químicamente (tanto con la alimentación como con los productos de limpieza), mecánica y térmicamente estables, y tener una permeabilidad elevada, alta selectividad y resistencia a las operaciones (Mercé, 2005).

1.4.3.3.1 Clasificación de las membranas semipermeables

Son varios los criterios de clasificación de las membranas. Entre los que se puede considerar la naturaleza química del material y su morfología (Zeman, 1996; Badillo, 2008).

a) De acuerdo con su naturaleza química. Se dividen en orgánicas e inorgánicas.

a.1) Membranas orgánicas. Pueden ser elaboradas de acetato de celulosa, polímeros orgánicos (polisulfonas, teflón, propilenos, poliamidas, polisulfuros, polipropilenos). Las membranas celulósicas son sensibles a la temperatura (50°C máximo), al deterioro químico (pH 3 a 8) y biológico. Por otro lado, las membranas poliméricas aunque resisten mejor los factores anteriores (temperaturas hasta 80°C y pH 2 -12), no soportan muy bien la compactación y los agentes clorados. Para este tipo de membranas, comúnmente, se presentan configuraciones planas y espirales, estas últimas maximizan el área en un mínimo espacio y consiste en capas consecutivas de membranas enrolladas en espiral dentro de un tubo de soporte en acero perforado (Chacón, 2000; Asiain, 1999).

En la figura 14, se presenta membranas orgánicas de forma espiral y tubular.

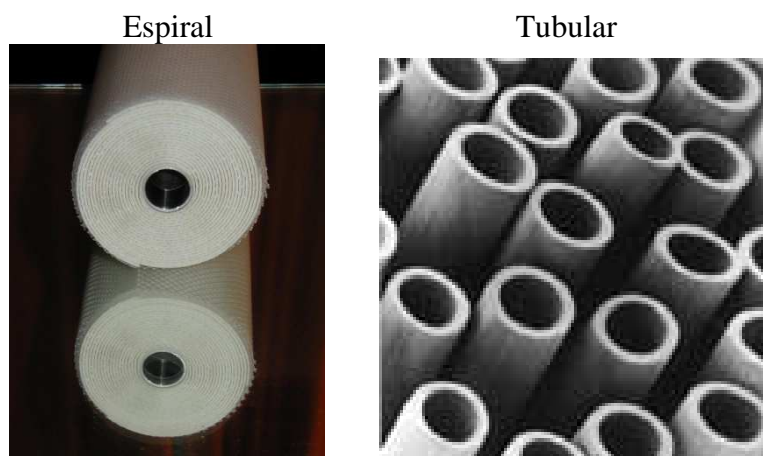


Figura 14. Membranas orgánicas
Vaillant, 2006

a.2) Membranas inorgánicas. Pueden ser elaboradas de sales inorgánicas tales como ZrO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 , son consideradas las más resistentes (pH 0 - 14, temperaturas alrededor de 300°C , presiones $> 1\text{MPa}$). Las membranas cerámicas son las más representativas de las membranas inorgánicas y se presentan en configuraciones tubulares, como se presenta en la figura 15. A diferencia de las membranas orgánicas son más frágiles y costosas (Asiain, 1999; Otero *et al.*, 2005).

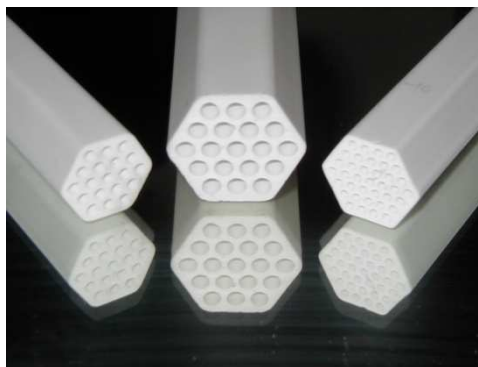


Figura 15. Membranas cerámicas tubulares multicanales
(Vaillant, 2006)

b) De acuerdo con su morfología. Las membranas se dividen en simétricas y asimétricas.

b.1) Membranas simétricas. Son aquellas en las que sus propiedades morfológicas (diámetro de poro y porosidad) y sus propiedades funcionales (permeabilidad, retención, etc.) son iguales por ambas caras de la membrana, lo que ocasiona problemas por pérdidas de cargas (aumento del consumo energético) y de colmatado de las membranas (Cheryan, 1998).

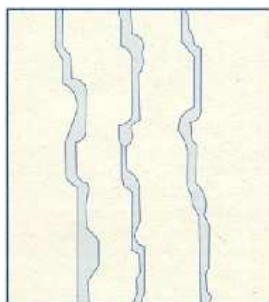


Figura 16. Estructura de una membrana simétrica.
(Asiain, 1999)

En la figura 16 se puede observar la estructura de una membrana simétrica.

b.2) Membranas asimétricas. Son aquellas que poseen propiedades morfológicas y/o funcionales distintas, según la cara de la membrana. Tienen diferentes materiales en la capa superior y en la subcapa. La primera llamada

también película, es responsable de las funciones principales de la membrana, ya que el flujo y selectividad solo depende de la estructura de esta capa. La subcapa está presente solo como soporte mecánico (Lara, 2002; Palacios, 1999).

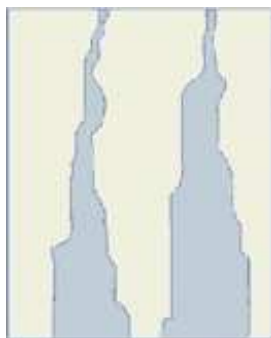


Figura 17. Estructura de una membrana asimétrica.
(Asiain, 1999)

En la figura 17 se puede observar la estructura de una membrana asimétrica.

1.4.3.3.2 Módulos de membranas

Las membranas son delgadas y requieren de un soporte poroso, para soportar las presiones elevadas. La membrana y el soporte son conocidas como el módulo. Se debe conseguir un área superficial elevada en un volumen compacto que debe soportar correctamente las condiciones a fijar, respecto a la turbulencia, tensiones elevadas en la capa límite, pérdidas de presión, requerimientos del caudal volumétrico y energía, de igual manera la polarización debe ser mínima (Schirg, 2001).

Las consideraciones higiénicas también son importantes, no deberían haber espacios muertos y el módulo debería soportar una operación de tipo *clean- in- place*, tanto en la cara del concentrado, como en la del permeado. Las membranas deberían ser fácilmente accesibles, tanto para su limpieza, como para su sustitución. Otra posible ventaja sería la facilidad para recoger el permeado de cada membrana individual de un módulo, lo que permitiría evaluar el rendimiento individual (Brennan, 2006).

Los cuatro diseños principales se determinan en las configuraciones de tipo tubular (a), fibra hueca (b), placa plana (c) y espiral (d), como se muestra en la figura 18.

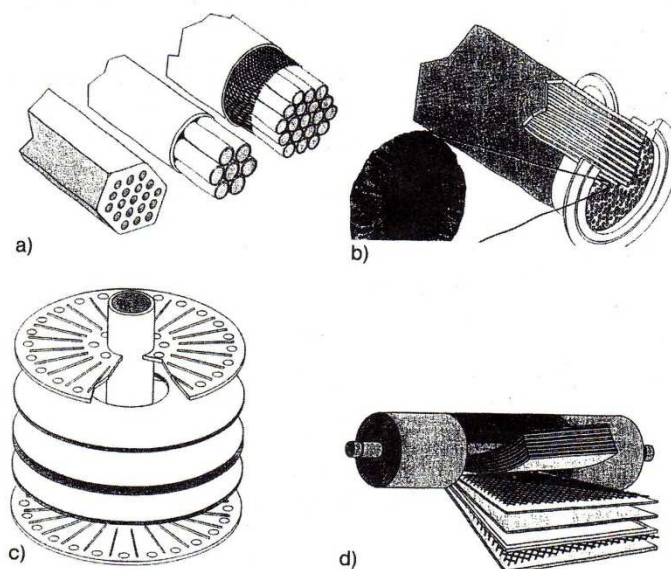


Figura 18. Tipos de configuraciones.
(Brennan, 2006)

a) Módulos tubulares. Poseen membranas tubulares y tubos perforados o porosos que les sirven de soporte, permiten resistir el gradiente de presiones con que deben trabajar. A medida que la solución circula por el interior hueco, esta se va permeando a través de las paredes (Chacón, 2006).

b) Módulos tubulares de fibra hueca. Es una configuración que posee miles de membranas de fibra hueca, dobladas en forma de “U” y colocadas paralelamente a un tubo central. Las fibras huecas son las membranas tubulares más pequeñas disponibles, con diámetros exteriores entre 80 y 500 μm . Se utilizan en osmosis inversa, permeado gaseoso y hemodiálisis. Con diámetros mayores (500–2.000 μm) se usan en ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF), en cuyo caso también se denominan membranas capilares (Chacón, 2006; Lara, 2002).

c) Módulos placas. Están formados por un conjunto de membranas planas apiladas juntas, generalmente de forma rectangular o de disco. Se apoyan sobre mallas de drenaje o placas porosas que les sirven de soporte. Las membranas se mantienen separadas, entre sí, por medio de espaciadores en ancho aproximado de 2 mm. La solución de alimentación fluye a lo largo de estrechos canales, que atraviesan los conjuntos de membranas que puedan ensamblarse a partir de las membranas individuales (Schirg, 2001; Lara, 2002; Brennan, 2006).

d) Módulos en espiral. Consisten en capas consecutivas de membranas enrolladas en espiral dentro de un tubo de soporte en acero perforado. Este tipo de configuración no es muy usada (Chacón, 2006).

1.4.3.4 Pre-tratamiento enzimático

En la MFT, el uso de las preparaciones enzimáticas comerciales, como tratamiento previo a las materias primas, es de vital importancia, debido a que clarificar los jugos pulposos es muy tedioso, debido a la alta concentración de sólidos en suspensión. La alta concentración de macromoléculas que se acumulan en la superficie de la membrana produce una capa dinámica que, en algunos casos, forma una capa impermeable, de tipo gel. El efecto de la hidrólisis enzimática es destruir las macromoléculas en moléculas más pequeñas y mejorar los flujos del permeado y por lo tanto disminuir el efecto de colmataje (Vaillant, 1999).

La selección de la preparación enzimática apropiada, que trabaje de forma sinérgica con los procesos mecánicos (pulverización, prensado, filtración etc.), ayuda a obtener extractos de calidad, estables, completamente naturales y a maximizar la eficacia del equipo utilizado en los tratamientos (Madrid, 2001).

La influencia de las enzimas en el flujo es explicada por Le Blanc (1997) de la siguiente forma: Inicialmente se observa una disminución del flujo del permeado, debido a que las partículas se acumulan en la pared de la membrana y forman la

capa de colmataje. La velocidad de formación, de esta capa, es superior a la velocidad de acción de las enzimas. Luego, se observa un aumento de flujo en el permeado, debido a que en los alrededores de la membrana, donde se forma la capa de colmataje, aumenta la concentración de macromoléculas, que son los sustratos de las enzimas (Hart, 1989).

Se produce, entonces, un aumento de flujo debido a que la velocidad de acción de las enzimas es superior a la velocidad de formación de la capa de colmataje. Luego de cierto tiempo el flujo del permeado tiende a ser constante debido a que se ha establecido un equilibrio entre la velocidad de formación de la capa de colmataje y la velocidad de acción de las enzimas. Lo expuesto se debe a que las enzimas son retenidas por la membrana y se concentran en la capa de la polarización (Hart, 1989).

1.4.3.5 Sistemas de operación

Los sistemas de operación pueden ser discontinuos y continuos, que se detallan a continuación:

a) Sistema discontinuo (Batch). Mediante este método se recircula continuamente el concentrado (retenido) hasta obtener el grado de concentración deseado; mientras, se retira continuamente el permeado. Se parte con un cierto volumen inicial de producto que se va a recircular y concentrar en el equipo. Este sistema es simple de construir y de controlar, puesto que el proceso termina cuando el producto alcanza las características finales deseadas. Durante la operación, la membrana está expuesta a una concentración variable, pequeña al comienzo y gradualmente mayor a medida que avanza el proceso. La principal desventaja radica en que el sistema se presuriza y despresuriza en cada pasada, lo que energéticamente resulta poco económico (Saavedra y Romero, 1999; Schirg, 2001).

En la figura 19 se presenta el esquema de un sistema discontinuo.

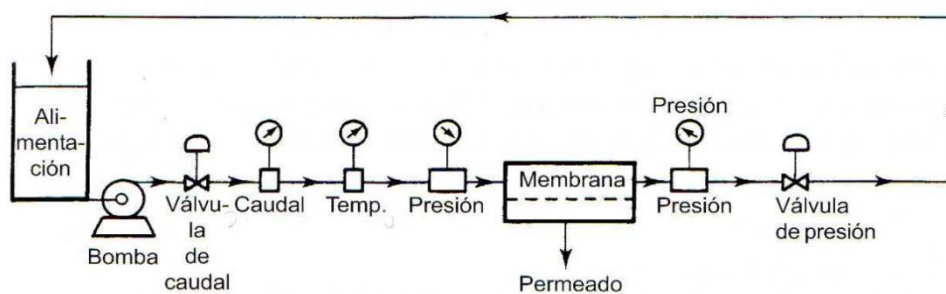


Figura 19. Esquema de un sistema discontinuo
(Brennan, 2000)

a) **Sistema continuo.** En esta modalidad la alimentación pasa solo una vez por el módulo. Para lograr un nivel de concentración determinada, se instalan varios módulos dispuestos en arreglos serie-paralelo. Este tipo de configuración se emplea cuando no se requieren altos factores de concentración, como es el caso de las plantas desalinizadoras de agua de mar por osmosis inversa. (Schirg, 2001). En la figura 20, se muestra un esquema de la operación continua.

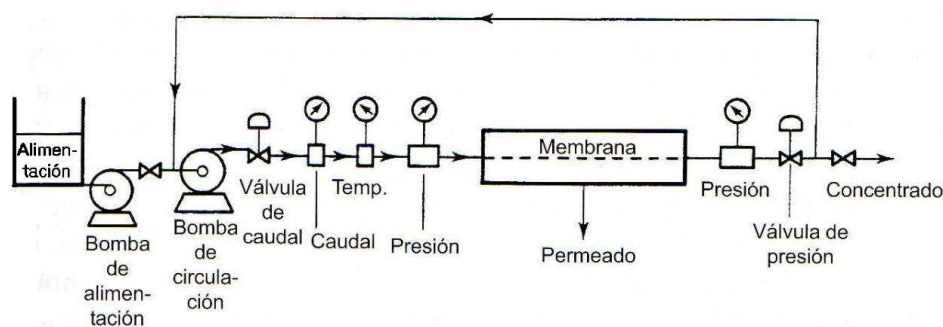


Figura 20. Esquema de operación continua
(Brennan, 2000)

1.4.4 USOS DE LA MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL

La primera aplicación de la MFT fue en el análisis microbiológico del agua, y poco a poco se extendió su uso a la industria biotecnológica y de alimentos. Se ha consolidado plenamente en la actualidad, en algunos campos, como los detallados en la tabla 6 (Guadix, 2001).

Tabla 6. Aplicaciones de la microfiltración tangencial

TIPO DE INDUSTRIA	APLICACIÓN
Alimentaria	Se utiliza en la esterilización en frío de vinos y jugos de frutas. Además, se usa para la clarificación de zumo de frutas, vino y cerveza, así también en la recuperación de células.
De componentes eléctricos	Se usa en la purificación de agua en la industria de semiconductores por la eliminación de micro-contaminantes.
Lechera	Se usa para la remoción de grasa del suero y en la remoción de bacterias de la leche.
Farmacéutica	Esterilización del agua para fabricación de soluciones y también para consumo humano.
Otras	Se aplican también para la recuperación de metales como óxidos o hidróxidos coloidales, el tratamiento de aguas residuales y de superficies, la separación de emulsiones aceite-agua, la remoción de bacterias y células de levaduras y la recuperación de pigmentos de látex de las pinturas.

* Huisman, 1998

La tecnología de filtración por membranas de flujo cruzado ha adquirido rápidamente aceptación global, por ser un paso de fabricación importante para muchas industrias en el mundo. La capacidad para producir separaciones y purificaciones muy específicas, a temperaturas bajas o ambientales, con frecuencia hace que la filtración por membranas sea una tecnología más rentable que los métodos más convencionales, como los filtros rotatorios al vacío o los filtros prensa (Huisman, 1998).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES

2.1.1 MATERIA PRIMA

La investigación se realizó con frutas de arazá provenientes del clon 003, presentadas en la figura 22. Las frutas fueron cosechadas en su estado de madurez organoléptica de las huertas de la Granja Experimental San Carlos, de la Estación Experimental Central de la Amazonía, del INIAP y de los productores de la Provincia de Francisco de Orellana.



Figura 21. Clon 003 de arazá

Las frutas fueron recibidas en el área de procesamiento de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP. Se seleccionaron las que se encontraban en buen estado y se eliminaron las impurezas. Se lavaron y desinfectaron con un microbicida natural y orgánico, extraído a partir de la semilla de la toronja y que se comercializa en los supermercados del país, el cual no altera el olor ni el sabor de los alimentos. El microbicida se utilizó de acuerdo con la recomendación de los fabricantes, en una concentración de 2,5 ml de Star-Bac domestic por litro de agua. La fruta se sumergió durante 5 minutos.

Se procesó la pulpa en forma mecánica, en un despulpador horizontal de acero inoxidable, con una potencia de 3 HP y una capacidad nominal de 250 kg/h, se

usó un tamiz con diámetro del orificio de 0,70 mm y el espacio entre orificios de 0,82 mm. Luego, se refinó la pulpa, para lo cual se pasó a través de un tamiz con un diámetro de orificio menor a 0,50 mm y con un espacio entre orificios de 1,00 mm. La pulpa refinada se colocó en envases de plástico de 20 l y se almacenó en un cuarto de congelación a -18° C.

2.1.2 EQUIPOS Y MATERIALES

Los materiales y los equipos que se utilizaron con los métodos de análisis de toda la investigación, se encuentran detallados en el anexo A, en cada método.

2.1.3 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en dos fases. En la primera fase se extrajo y caracterizó la pared celular de la pulpa de arazá y se seleccionó el cóctel enzimático comercial y las condiciones de temperatura, concentración y tiempo, requeridos en el pretratamiento enzimático de la pulpa.

En la segunda fase se optimizaron las condiciones de trabajo de la microfiltración tangencial, para la pulpa de arazá tratada enzimáticamente. En el anexo A, se presenta el manual de manejo del módulo de microfiltración tangencial y el proceso de limpieza.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR

Para la caracterización de la pared celular de la pulpa de arazá, se realizó la extracción de la pared celular bruta (PCB) o materia insoluble en alcohol (MIA), para lo cual se trató la pulpa congelada con alcohol etílico al 95 %, a ebullición, durante 20 minutos, se filtró a través de tela muselina y se realizaron constantes lavados con etanol calentado a 60° C al 80 %, hasta que la prueba cualitativa de la presencia de azúcares, con el reactivo antrona, resulte negativa.

Posteriormente, se realizaron varios lavados con agua destilada a 4° C, se centrifugó y se separó el sobrenadante, que correspondió a la pectina soluble en agua (PSA). El residuo se lavó varias veces con agua destilada fría, se centrifugó y todos los sobrenadantes se unieron.

El residuo de la centrifugación se liofilizó y se molió hasta un tamaño de partícula menor a 0,5 mm, que representa a la materia insoluble en alcohol y agua (MIAA), en la que se analizó el contenido de proteína y almidón, para comprobar que sea menor al 3 %. En caso contrario, se realizó una proteólisis con papaína y amilolisis con alfa amilasa y amiloglucosidasa, con el objeto de purificarla. Con lo que se obtuvo la pared celular purificada (PCP) o MIAA.

La caracterización de la MIAA se realizó con la determinación del contenido de almidón, proteína, ceniza, celulosa, hemicelulosa y lignina. En la PSA se determinó el contenido de ácido galacturónico y de ésteres metílicos, con los que se calculó el grado de esterificación de la pectina de acuerdo a la clasificación presentada en la revisión bibliográfica. Los métodos de laboratorio detallados se presentan en el anexo B de las diferentes determinaciones químicas.

2.2.2 SELECCIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO COMERCIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA PULPA CONGELADA DE ARAZÁ

2.2.2.1 Factores de estudio

- Temperatura del tratamiento enzimático
- Tiempo del tratamiento enzimático
- Concentración del cóctel enzimático comercial

2.2.2.2 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por 5 kg de pulpa refinada y congelada de arazá (*Eugenia stipitata*).

2.2.2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los tratamientos, se utilizaron dos programas, el JMP® versión 5.1 y el Statgraphics Plus 4.0. El análisis funcional se determinó por el coeficiente de variación en porcentaje, así como la prueba de significación de Tukey, al 5 %, para los tratamientos.

2.2.2.4 Procedimiento

a) Selección de la temperatura del tratamiento enzimático

Para la selección de la temperatura, se realizó una evaluación sensorial con la finalidad de determinar el efecto de la temperatura sobre las características sensoriales y organolépticas de la pulpa. Para esto se utilizó una prueba Duo-Trio, con 20 panelistas, con dos repeticiones. La hoja de evaluación se presenta en el anexo D.

Se calentó la pulpa de arazá a 30, 35, 40 y 45° C durante una hora y se comparó la existencia de cambios sensoriales contra una muestra testigo a temperatura ambiente de 25° C. La ecuación que se utilizó para el análisis estadístico se presenta a continuación (Meilgaard *et al.*, 1990). La selección se realizó con base en el segundo valor más alto de la probabilidad de semejanza analizada para cada temperatura.

$$P_{\max} = \left(2 \left(\frac{x}{n} \right) - 1 \right) + Z_{\beta} \sqrt{\frac{4 \left(\frac{x}{n} \right) \left(1 - \left(\frac{x}{n} \right) \right)}{n}} \quad [9]$$

Donde:

P_{\max} : probabilidad de semejanza

x : número de panelistas que no percibieron cambios sensoriales

n : población muestral

Z_{β} : factor de probabilidad de acierto general

b) Selección del cóctel enzimático comercial

Como primer paso para la selección del cóctel enzimático comercial se procedió a analizar los resultados obtenidos en la caracterización química de la pared celular purificada (contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, proteína y almidón) con las principales actividades enzimáticas obtenidas en cada uno de los siete cócteles comerciales.

Se midió el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la solubilización, con los cócteles enzimáticos en la pulpa de arazá a la temperatura seleccionada, a una concentración de 300 ppm durante una hora, con la finalidad de encontrar el cóctel que mejor solubilice la pulpa.

c) Selección del tratamiento enzimático

Para la determinación de los tratamientos, que comprende la concentración (X_2) y el tiempo (X_1) del tratamiento enzimático, se planteó la utilización de un plan de superficie de repuesta de 10 puntos, con 8 observaciones y 2 puntos centrales que permiten obtener una mayor precisión para encontrar el mejor tratamiento, como se observa en la figura 23 y producto del plan de experiencia se llegó a determinar los tratamientos que se presentan en la tabla 7 (Goupy, 1999).

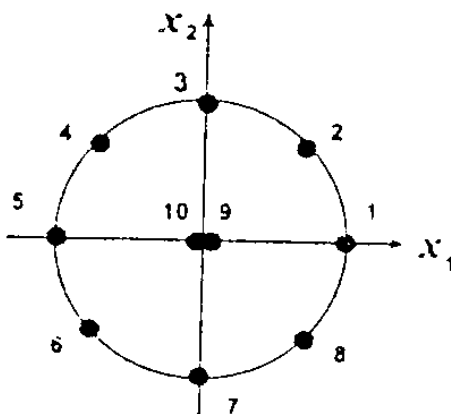


Figura 22. Disposición de los diez puntos experimentales entorno a la circunferencia (Goupy, 1999)

Tabla 7. Tratamientos obtenidos en base al plan de experiencia con dos variables

Tratamientos	Concentración de enzima ppm	Tiempo minutos
T ₁	200	120
T ₂	310	100
T ₃	350	60
T ₄	310	20
T ₅	200	0
T ₆	90	20
T ₇	50	60
T ₈	90	100
T ₉	200	60
T ₁₀	200	60

Para cada tratamiento enzimático de la pulpa de arazá se utilizaron 150 g, que se colocaron en baño maría, a la temperatura seleccionada, con la concentración del cóctel enzimático, durante el tiempo correspondiente a cada tratamiento. Luego del cual, las muestras fueron sumergidas en agua fría, a 4° C durante diez minutos. Se utilizó como blanco la pulpa de arazá sin tratamiento enzimático y posteriormente, se realizaron los respectivos análisis con cada tratamiento.

2.2.2.5 Métodos de control y evaluación

Los métodos de análisis se encuentran detallados en el anexo B. Las variables que fueron determinadas en la pulpa con tratamiento enzimático y el blanco, así como en el sobrenadante de la centrifugación son:

Sólidos Insolubles en Suspensión (SIS): En la pulpa tratada enzimáticamente se midió por diferencia de peso, luego de un proceso de centrifugación (3 500 rpm durante 15 minutos) (A.O.A.C., 2007).

Viscosidad dinámica: En la pulpa tratada enzimáticamente se utilizó un viscosímetro Brookfield, con un adaptador para muestras pequeñas (Alvarado, 1996).

Viscosidad cinemática: En el sobrenadante de la centrifugación se utilizó un viscosímetro Cannon-Fenske, a una temperatura de 25° C (Singh y Heldman, 2001; Alvarado, 1996; Green y Perry, 2008).

Consistencia: En la pulpa con y sin tratamiento enzimático se midió en un consistómetro Bostwick, a temperatura ambiente de 25°C, y se midió la distancia en centímetros que fluye la pulpa por su propio peso, durante 60 segundos, en una pendiente con un ángulo de 15° (Green y Perry, 2008).

2.2.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO EN LA MFT PARA LA OBTENCIÓN DE LOS MEJORES RENDIMIENTOS DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ

2.2.3.1 Factores de estudio

Presión transmembranaria (PTM): 1, 2 y 3 bar

2.2.3.2 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por 50 l de pulpa de arazá refinada y congelada, obtenida con el mejor tratamiento enzimático de la primera fase.

2.2.3.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente, mediante medidas de tendencias, que se determinaron con ayuda de los programas Microsoft Excel 2007 y Statgraphics plus 4.0.

2.2.3.4 Procedimiento

En la segunda fase de la investigación, se utilizó la pulpa de arazá obtenida con el tratamiento seleccionado en la primera fase, para determinar las condiciones óptimas de operación para el módulo de MFT en la obtención del jugo clarificado.

Los componentes del equipo se describen en la figura 24 y se detallan a continuación:

La bomba de alimentación (BE), tiene un caudal variable, es una bomba de desplazamiento positivo, con un cuerpo en acero inoxidable 316 y engranajes en Ryton[®], marca Micropump. La presión diferencial máxima que puede alcanzar es 10,3 bar (140 PSI), con caudal estable independiente de la presión, y caudal máximo de 2,0 l/min a 3 600 rpm acoplado a un motor eléctrico de 230 V y 0,37 kW, de velocidad fija de 3 000 rpm; se encuentra conectada a un variador de frecuencia manual.

Una bomba de recirculación (BC), es una bomba centrifuga de grado sanitaria, con cabeza en acero inoxidable 316 con caudal fijo, de 15 m³/h (agua) a 1 bar de presión diferencial. La que se encuentra acoplada a un motor de 1,0 HP con una velocidad fija de 3 600 rpm.

El circuito cuenta con un intercambiador de calor tubular y un módulo en acero inoxidable de 1 020 mm de largo, con 1 membrana Membralox[®] P19-40 (19 canales de 4 mm de diámetro) en alfa-alumina con tamaño de poros de 0,5 µm. La superficie de filtración instalada es de 0,24 m²

Para el monitoreo del proceso, el módulo cuenta con los siguientes accesorios: Tres válvulas de bola para la salida del retenido, permeado y para vaciar el circuito. Una válvula micrométrica para tomar muestras del retenido durante el proceso. Dos manómetros, para medir la presión de entrada y salida del módulo. Un termómetro, para medir la temperatura del retenido en el circuito.

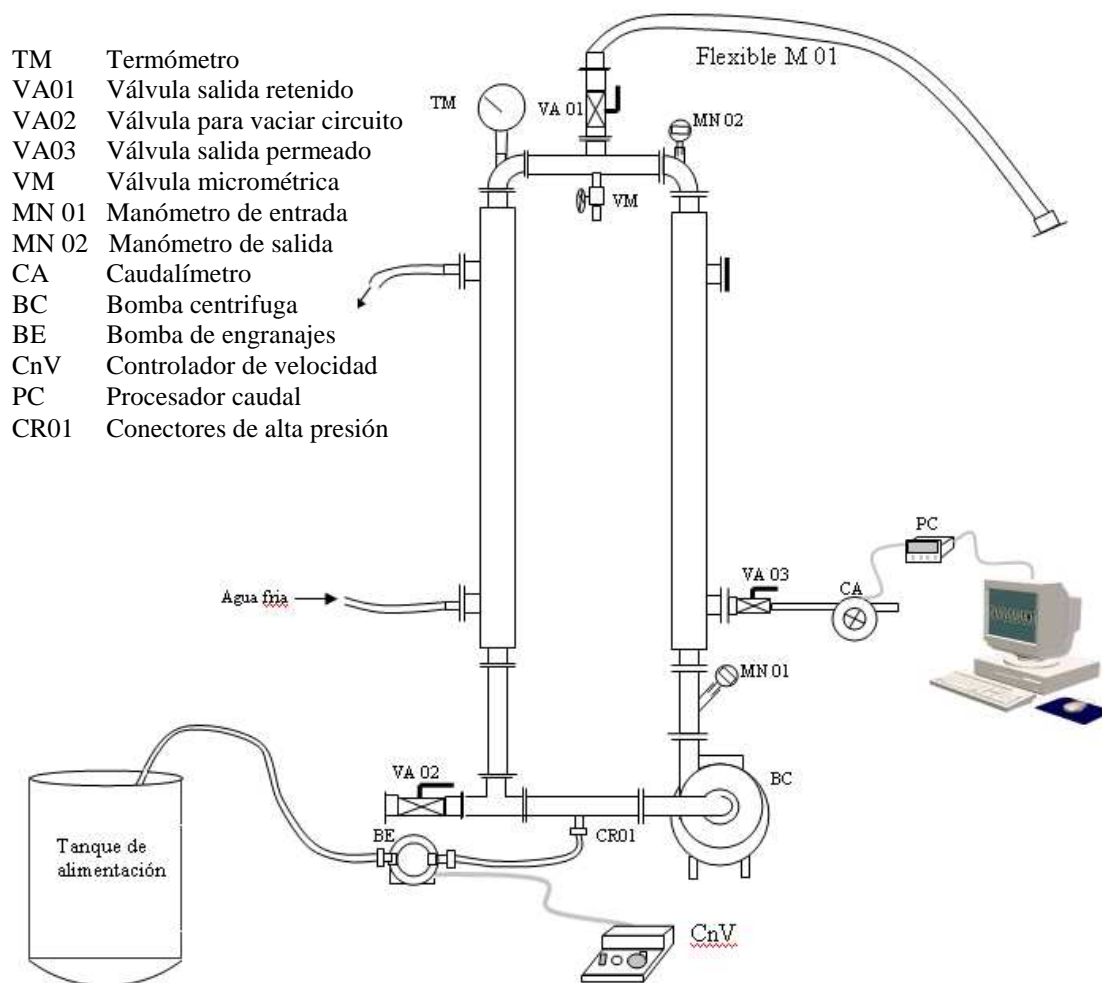


Figura 23. Descripción esquemática del módulo de MFT/UFT

a) Condiciones de operación

En todos los ensayos, se mantuvo la temperatura del tratamiento enzimático seleccionado en la primera fase de 40°C. La velocidad lineal que proporcionó el equipo fue de 5 m.s⁻¹. La permeabilidad de la membrana que se utilizó fue de 232,38 l.h⁻¹.m⁻² (anexo A).

Se realizaron tres repeticiones del ensayo preliminar, hasta que el porcentaje de error fue menor al 10 %. Se fijó la PTM en 1 bar, posterior al pretratamiento enzimático se procedió a microfiltrar la pulpa, se registraron cada minuto los datos de, volumen de permeado, presión de entrada y salida, temperatura y peso del permeado que se encuentran señalados en la tabla 8. El volumen del permeado se recogió en una probeta y se procedió a medir el peso respectivo.

Tabla 8. Registro de datos del ensayo de microfiltración tangencial

Tiempo (min)	Vol. del permeado (ml)	Flujo del permeado F_p (l. h ⁻¹)	Presión Entrada (bar)	Presión Salida (bar)	Temperatura (° C)	Peso del permeado (g)

Se calculó el flujo del permeado por unidad de área de la membrana (J_p) en unidades de $l\ h^{-1}\ m^{-2}$, se graficó el flujo del permeado (J_p) y el factor de reducción volumétrica (FRV), en función del tiempo. En la MFT se trabajó en *modo continuo* y se procedió a clarificar la pulpa tratada enzimáticamente, cuando se alcanzó el FRV óptimo y el J_p , correspondiente, se calculó el volumen del retenido requerido para evitar la colmatación de la membrana. Se evaluó el rendimiento del proceso optimizado, para la obtención del jugo clarificado de arazá.

b) Determinación de la PTM óptima

Se realizó un ensayo de MFT con un *FRV* de 1 y en *modo de recirculación*, a 1, 2 y 3 bar de *PTM*. Para el cálculo de la *PTM* y del J_p , se utilizaron las ecuaciones 1 y 2, descritas en el acápite 1.4.3.2. En cada uno de los ensayos, se registró el volumen y F_p , la temperatura y la presión de entrada y salida, los mismos que fueron determinados cada minuto.

c) Determinación del J_p y FRV óptimos

Una vez establecida la presión transmembranaria óptima, se realizaron los ensayos en *modo concentración*. En cada repetición, se registraron los parámetros indicados en la tabla 8, cada dos minutos. Para el cálculo del factor de reducción volumétrica se utilizó la ecuación 7, descrita en el acápite 1.4.3.2.

d) Determinación de la relación entre la PTM y el FRV

Se realizó un ensayo con la variación de la *PTM* correspondiente a cada factor de

reducción volumétrica. Los valores de PTM y FRV que se aplicaron fueron los siguientes:

PTM: 1,0; 2,0 y 3,0 bar

FRV: 2,3; 4,7 y 6,3

Para la determinación de este ensayo se inició en *modo concentración*, cuando se alcanzó el FRV deseado, se trabajó en *modo de recirculación*; hasta alcanzar la PTM establecida. Se registraron los valores del Fp para cada valor de PTM. Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento hasta alcanzar los siguientes valores de FRV.

e) Obtención del rendimiento y caracterización física y química del permeado y retenido de arazá

La pulpa refinada y congelada se procesó a las condiciones óptimas encontradas con el mejor tratamiento enzimático y en la microfiltración tangencial, obteniéndose el permeado y el retenido. En el anexo C, se puede apreciar un esquema de las diferentes fases del proceso para obtener el jugo clarificado de arazá.

Las determinaciones físicas y químicas que se realizaron en el permeado y el retenido del arazá fueron: color, sólidos solubles, sólidos insolubles en suspensión, turbidez, viscosidad dinámica, viscosidad cinemática y pH. El valor nutricional se reportó como el contenido de azúcares totales y reductores, macro y micro elementos, carotenoides, polifenoles y vitamina C. La capacidad antioxidante se analizó con base en el aporte de algunos nutrientes, según la investigación realizada por Garder *et al.*, 2000.

2.2.3.5 Métodos de control y evaluación

En el permeado y el retenido obtenido de la MFT se determinaron los siguientes parámetros como se indicó en el acápite 2.2.2.5, a excepción de los siguientes:

pH: Se midió directamente con un medidor de pH en el permeado y el retenido (A.O.A.C., 2007).

Sólidos Solubles: Se midieron los sólidos solubles por medio de un refractómetro manual en el permeado y el retenido (A.O.A.C., 2007).

Color: Se midió directamente en un medidor de color en el permeado y retenido (Manual ColorTec PCM/PSMTM; Alvarado y Aguilera, 2001).

Turbidez: Se utilizó un fotómetro para medir la turbidez en unidades nefelométricas en el permeado y el retenido (Tecan Schweiz AG, 2002).

Prueba sensorial: Se realizó con 30 catadores no entrenados una prueba de preferencia entre la pulpa y el jugo clarificado de arazá. Se calculó con una probabilidad de uno o más juicios correctos con base en el número de catadores. La hoja para la prueba de preferencia se presenta en el anexo D.

Las muestras para el análisis sensorial se prepararon con el jugo clarificado y el jugo pulposo de arazá, en una relación 40 % de agua y 60 % de jugo, endulzado hasta 8° Brix, con sacarosa comercial. Las muestras se codificaron con tres dígitos y se alternaron durante la catación.

Para el análisis se plantearon dos hipótesis que son: las dos muestras son iguales y la muestra de jugo pulposo de arazá es diferente a la muestra de jugo clarificado. De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas, se procedió a verificar el número de respuestas correctas con base en el total de catadores que encontraron alguna diferencia entre las dos muestras, la misma que mostró la probabilidad obtenida y que fue comparada con una probabilidad del 0,05, de tal forma que permitió comprobar una de las hipótesis planteadas, datos que se encuentran en la tabla del anexo E (Meilgaard *et al.*, 1990).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR

3.1.1 RENDIMIENTOS EN LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PARED CELULAR DE ARAZÁ

Los rendimientos obtenidos en la extracción de la pared celular bruta (PCB), la pared celular purificada (PCP) y la pectina soluble en agua (PSA), a partir de la pulpa refinada y congelada de arazá, se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Rendimientos de pulpa a fruta, de PCB a pulpa, de PCP a PCB y de PSA a PCB de arazá

FRUTA	RENDIMIENTOS*			
	Pulpa** a Fruta** (%)	PCB*** a Pulpa** (%)	PCP*** a PCB*** (%)	PSA *** a PCB*** (%)
Arazá	61,00 ± 4,57	1,24 ± 0,01	94,05 ± 0,06	5,95 ± 0,06

* Rendimiento promedio, \pm desviación estándar, n = 3 repeticiones

** En muestra fresca

*** En muestra seca

El rendimiento de la PCB para la pulpa de arazá es de 1,24 %, valor que se encuentra en el rango de los reportados por Brito, en el 2003 y el 2008, para otras frutas, como las variedades de mango Tommy Atkins y Kent con 1,70 y 1,45 %, respectivamente, la uvilla ecotipo Golden Keniana con 1,45 % y granadilla variedad Colombiana con 0,75 %.

El arazá presenta un bajo contenido de pectina soluble en agua con 5,95 %, poco interesante para la industria de los jugos pulposos y conservas. En los estudios realizados por Brito, en el 2008, se reportó para la uvilla 6,53 % de PSA, si se compara con lo encontrado en la guayaba que se caracteriza por el alto contenido de pectina con 35 %, lo que indica que tanto el arazá como la uvilla necesitan una

aportación adicional de pectina para la elaboración de conservas, proceso que no es requerido en la guayaba.

3.1.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA PARED CELULAR DE ARAZÁ

Para la caracterización química de la pared celular purificada (PCP), se determinaron los contenidos de hemicelulosa, celulosa, lignina, almidón, proteína, cenizas, y por diferencia al contenido del 100 por ciento se obtuvo la pectina insoluble. Los valores promedios de cada determinación se reportan en la tabla 10.

Tabla 10. Caracterización química de la pared celular purificada, en la pulpa de arazá

CONTENIDO*	PCP DE ARAZÁ
Hemicelulosa (%)	11,18 ± 0,37
Celulosa (%)	24,55 ± 0,37
Lignina (%)	17,94 ± 0,90
Almidón (%)	3,49 ± 0,01
Proteína (%)	15,92 ± 0,01
Cenizas (%)	3,28 ± 0,01
Pectina Insoluble (%)	23,65 ± 0,88

* En base seca ± desviación estándar, n = 3 repeticiones

El contenido en la PCP, de la hemicelulosa y celulosa es del 11,18 % y 24,55 %, respectivamente, valores bajos con relación a lo obtenido en otras frutas como la granadilla, guayaba, tomate de árbol y chirimoya. En la bibliografía consultada para el mango, se reportan valores menores, entre el 7 y 8 %, según Brito, 2003 y 2008. El valor de la celulosa en la uvilla es de 24,42 % similares al reportado para la pulpa de arazá. Estos resultados orientan el tipo de cóctel enzimático por

seleccionar, debido a la similitud encontrada en la composición de la pared celular del arazá y la uvilla.

La cantidad de lignina en la pulpa de arazá es del 17,94 %, resultado alto frente a los obtenidos en frutas como es el caso del mango, granadilla y tomate de árbol.

El contenido de la pectina insoluble en la pulpa de arazá es alto con 23,64 %, valores similares a los reportados para el mango variedad Tommy Atkins con 21,80 % por Brito, en el 2003, valores que son considerados importantes al momento de seleccionar un cóctel enzimático comercial, ya que este debe poseer un porcentaje alto de enzimas pectinolíticas, para que de esta forma, con su actividad enzimática, puedan actuar sobre la pectina insoluble favoreciendo en determinados procesos en la industria de jugos.

Es importante estudiar la estructura de la PCB, ya que permite conocer la composición química de los polisacáridos de la fruta, responsables de las propiedades reológicas, que determinan los problemas tecnológicos en un determinado proceso industrial. Así mismo, sirve para seleccionar las características que debe tener el cóctel enzimático que se utilice como auxiliar tecnológico y que ayuda en la liquefacción de la pared celular, en el caso de la industria de los jugos, y en este caso, que permite obtener la pulpa de arazá con mejor solubilización para el proceso de microfiltración tangencial en términos de rendimiento.

3.1.3 CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA SOLUBLE EN AGUA

Para la caracterización de la PSA, extraída de la pared celular (PCB) de la pulpa de arazá, se determinó la concentración de metanol y ácido galacturónico, valores con los cuales se calculó el grado de esterificación de esta pectina. Los resultados se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis del grado de esterificación en la pectina soluble en agua de arazá

PULPA	ÁCIDO GALACTURÓNICO ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ pectina)	METANOL ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ pectina)	GRADO DE ESTERIFICACIÓN (%)
Arazá	$1,73 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,04$	$41,63 \pm 1,72$

*En base seca \pm desviación estándar, n = 3 repeticiones

El conocimiento del grado de esterificación de las pectinas permite ser utilizadas en los diferentes procesos de producción dentro de la industria agroalimentaria, medicina y nutrición, de acuerdo con sus propiedades físico-químicas y nutraceuticas. El grado de esterificación de la PSA de la pulpa de arazá es de 41,63 %, menor al 50 %, que se encuentra clasificada como una pectina de bajo grado de metilación o esterificación, de acuerdo con la categorización que presenta Arthey (1997). La pectina de esta fruta se puede utilizar para la producción de confituras dietéticas con diferente contenido en azúcar y para productos lácteos de bajo contenido de edulcorante.

3.2 SELECCIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO COMERCIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA PULPA CONGELADA DE ARAZÁ

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Para la selección de la temperatura del tratamiento enzimático se realizó un análisis sensorial con catadores no entrenados, de acuerdo con lo establecido en el capítulo dos los resultados del análisis sensorial se presentan en la tabla 12.

La temperatura seleccionada fue de 40° C, con una probabilidad máxima de semejanza de 34,12 % con relación a la muestra testigo; no se seleccionó la temperatura de 45° C, a pesar de que presentó la mayor probabilidad de semejanza con el testigo, para mantener un margen de seguridad en la pérdida

de la calidad organoléptica durante el procesamiento y por los altos costos que se generan, al elevar la temperatura en todo proceso industrial.

Tabla 12 Resultados del análisis sensorial duo-trío para la determinación de la temperatura del tratamiento enzimático

TEMPERATURA (° C)	PROBABILIDAD MÁXIMA (%)
30	3,75
35	14,12
40	34,12
45	43,75

90 % de confiabilidad

Este tipo de análisis fue utilizado por Badillo y Picho en el 2008, para seleccionar la temperatura de enzimación, los resultados que obtuvieron para la uvilla fue el más alto a 30° C y disminuyó a los 35 y 40° C, y se incrementó a los 45°C, en el caso de la granadilla se incremento la probabilidad entre los 30 a los 35° C y disminuyó con el incremento de la temperatura. Para el arazá, en los rangos probados, la probabilidad se incrementó con el aumento de la temperatura.

3.2.2 SELECCIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO COMERCIAL

En este ensayo se relacionó la composición de la pared celular del arazá obtenida y los valores correspondientes a las principales actividades enzimáticas de los cócteles comerciales, como son: la pectin-liasa (P_L), endoglucanasa (C_X), celobiohidrolasa (C_1), poligalacturonasa (P_G), pectin metil esterasa (P_E) y exoarabinasa (Exo ara), para la selección del cóctel enzimático comercial.

La caracterización de las principales actividades enzimáticas de diferentes cócteles comerciales se presenta en la tabla 13.

Tabla 13. Caracterización de las principales actividades enzimáticas en cócteles comerciales

CÓCTELES ENZIMÁTICOS COMERCIALES	Proteína (mg/ml)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (UI/mg proteína)					
		PL	CX	CI	PG	PE	Exoara
Rapidase Pineapple	56,750	0,713	4,889	0,218	7,580	3,580	0,026
Rapidase UF	66,180	0,712	1,794	0,060	3,940	2,620	0,720
Klerzyme 150	98,750	3,484	1,973	0,078	15,260	7,214	0,143
Clarex Citrus 12XL	89,320	3,550	1,966	0,063	9,670	6,159	0,174
Rapidase Vege. Juice	77,750	2,422	2,180	0,169	6,510	7,636	0,535
Rapidase TF	116,100	2,320	3,243	0,309	3,670	3,629	0,161
Rapidase Citrus UF	57,600	1,334	4,690	0,221	6,350	2,620	0,029

* Brito, 2006; FONTAGRO, 2008

Se seleccionó el cóctel enzimático Rapidase TF, debido a que la pared celular del arazá sobresale por el contenido de celulosa y requiere que el cóctel tenga alta actividad C_x y C_1 y, por su alto contenido de pectina insoluble, debe tener actividades considerables de P_L , P_G y P_E .

Las preparaciones enzimáticas comerciales han sido desarrolladas para realizar modificaciones a nivel molecular, especialmente para frutas de clima templado; pero los efectos tecnológicos dependen principalmente de la composición de la pared celular que es propia de cada fruta. Estos cócteles están constituidos por una mezcla de enzimas, principalmente de hemicelulasas, celulasas y pectinasas, las cuales producen liquefacción y sacarificación de las paredes celulares de los tejidos en las pulpas de las frutas, además, hidrolizan los polisacáridos insolubles mediante la acción sinérgica de las enzimas celulolíticas y pectinolíticas.

Es importante indicar que los valores reportados, pueden cambiar de un lote a otro de producción de la empresa que los elabora, o disminuir la actividad por efecto de una conservación poco apropiada.

Para confirmar la selección del cóctel enzimático, se analizó en la pulpa enzimada de arazá con las siete preparaciones el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la solubilización, resultados que se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Efecto del tratamiento enzimático* con cócteles comerciales, sobre el contenido de SIS y la solubilización en la pulpa de arazá

CÓCTEL ENZIMÁTICO	SIS (%)	SOLUBILIZACIÓN (%)
Blanco	46,52 ± 0,05	0,00
Klerzyme 150	28,05 ± 1,01	39,70 ± 1,81
Rapidasa Vegetal Juice	27,96 ± 0,78	39,91 ± 1,30
Clarex Citrus 12 XL	27,74 ± 1,02	40,36 ± 2,56
Rapidasa UF	27,57 ± 0,15	40,74 ± 0,04
Rapidasa Pineapple	27,56 ± 0,48	40,75 ± 1,40
Rapidasa Citrus UF	27,42 ± 0,39	41,05 ± 1,06
Rapidasa TF	26,31 ± 0,05	43,44 ± 0,23

* Condiciones del tratamiento enzimático: 300 ppm, 1 hora, 40 ° C
± desviación estándar, n = 3 repeticiones

Los resultados confirmaron la selección del cóctel enzimático Rapidase TF, con el que se obtuvo la mayor solubilización de la pulpa de arazá, con un 43,32 % y el menor contenido de sólidos insolubles en suspensión del 26,31 %.

3.2.3 SELECCIÓN DEL TIEMPO Y LA CONCENTRACIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO COMERCIAL SELECCIONADO

Para la selección del mejor tratamiento en la pulpa de arazá, con el cóctel enzimático Rapidase TF, se usó un plan de superficie de respuesta de diez puntos, con dos puntos centrales, cuyos resultados para las variables de control

se presentan en la tabla 15. La solubilización se calculó con los resultados obtenidos para el contenido de SIS del blanco y en cada tratamiento.

Tabla 15. Control de calidad de los tratamientos en la pulpa enzimada de arazá

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO	TIEMPO	SIS	SOLUBILIZACIÓN	VISCOSIDAD CINEMÁTICA * ¹	VISCOSIDAD DINÁMICA ** ¹	CONSISTENCIA ¹
	(ppm)	(min)	(%)	(%)	(cSt)	(cP)	(cm/min)
T ₁	200	120	27,96±0,03	47,55±0,54	1,06	15,00	18,50
T ₂	310	100	27,39±0,09	48,62±0,42	1,06	12,50	20,00
T ₃	350	60	30,13±0,41	43,48±1,40	0,97	12,50	19,50
T ₄	310	20	29,74±0,48	44,21±0,26	1,15	25,00	18,50
T ₅	200	0	37,50±0,25	29,66±0,32	2,03	300,00	14,50
T ₆	90	20	38,19±0,64	28,36±0,38	1,86	75,00	14,50
T ₇	50	60	47,01±0,64	11,83±2,20	2,56	112,50	14,00
T ₈	90	100	31,00±1,15	41,85±2,17	1,33	37,50	17,50
T ₉	200	60	31,24±0,57	41,39±0,41	1,15	25,00	18,00
T ₁₀	200	60	30,56±0,35	42,68±0,02	1,24	25,00	18,00
Blanco	-	-	53,31±0,60	0,00	5,89	312,50	14,00

± desviación estándar, n = 3 repeticiones

* Sobrenadante de la centrifugación

¹ ± 0,00

** 100 rpm, spindle N. 14

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede confirmar la relación que existe entre los tratamientos de la pulpa de arazá (concentración del cóctel y el tiempo del tratamiento enzimático) y las variables de control. Los resultados demostraron que a mayor concentración y tiempo, existe una mayor solubilización

y menor consistencia, viscosidad dinámica, viscosidad cinemática y el contenido de sólidos insolubles en suspensión.

En el tratamiento T_2 , con una concentración del cóctel enzimático de 310 ppm y un tiempo de 100 minutos se obtuvo la mayor solubilización con 48,62 % y el menor valor de SIS con 27,39 %. Pero en los tratamientos T_9 y T_{10} , que corresponde a los dos puntos centrales, con una concentración del cóctel enzimático comercial de 200 ppm y con 60 minutos de tratamiento enzimático, la solubilización y los SIS fueron de 31,24 % y 41,39% y, 30,56% y 42,68%, respectivamente, tratamientos que fueron seleccionados como las condiciones óptimas del proceso.

Para el T_9 y T_{10} , se requiere aumentar 40 minutos en el proceso enzimático, para obtener un aumento en la solubilización de la pulpa hasta del 48,62 %, lo que representa un 7 % de diferencia, que desde el punto de vista industrial, no es económicamente beneficioso, principalmente por el aumento de los costos de producción, que se relacionan con la mayor concentración de enzimas y el tiempo.

Con la máxima concentración del cóctel y con 60 minutos del proceso se obtuvo 30,13 % de SIS, que representa 43,48 % de solubilización, lo que significa que se redujo aproximadamente el 23 % de SIS, con respecto al blanco; mientras tanto, que con la mínima concentración y con el mismo tiempo del proceso se obtuvo 47,01 % de SIS y un 11,83 % de solubilización, lo que representa una disminución aproximada del 6 % de SIS, con respecto al blanco.

Por lo tanto, para los tratamientos seleccionados T_9 y T_{10} se obtuvo un valor promedio de SIS y de la solubilización con 30,9 % y 42,04 %, respectivamente, lo que representa una disminución de los SIS del 22 %. Es decir, que para obtener un aumento de la solubilización de la pulpa, en el orden del 1 %, se requiere aumentar 14,3 % más de concentración del cóctel enzimático, que desde el punto de vista industrial no representa una buena inversión

Los resultados fueron analizados estadísticamente, para lo cual se obtuvo una superficie de respuesta con todos los tratamientos y en cada una de las variables de control, se demostró, que las variables que influyen significativamente son la concentración y el tiempo del tratamiento enzimático. Se utilizaron gráficas 3D con la ecuación de Guassiana.

En la figura 25, se presenta la superficie de respuesta del contenido de SIS para los tratamientos. La tendencia de la relación es inversamente proporcional, debido que a mayor concentración y tiempo del tratamiento enzimático, disminuye el contenido de SIS, lo cual se debe a la acción sinérgica de las diferentes actividades enzimáticas que contiene el cóctel Rapidasa TF, que actúan sobre los componentes de la pared celular del arazá y que rompen las cadenas de los polisacáridos, conocida como liquefacción enzimática.

La ecuación que relaciona las tres variables para el análisis estadístico, está dada por la concentración del cóctel enzimático (y), el tiempo del tratamiento enzimático (x) y el porcentaje de sólidos insolubles en suspensión (z). Se obtuvo un R^2 de 0,74 y fue la siguiente:

$$z = 276,473 * \exp (-0,5 * (((x - (-2937,13))/1549,5)^2 + ((y - 13,6711)/144,176)^2))$$

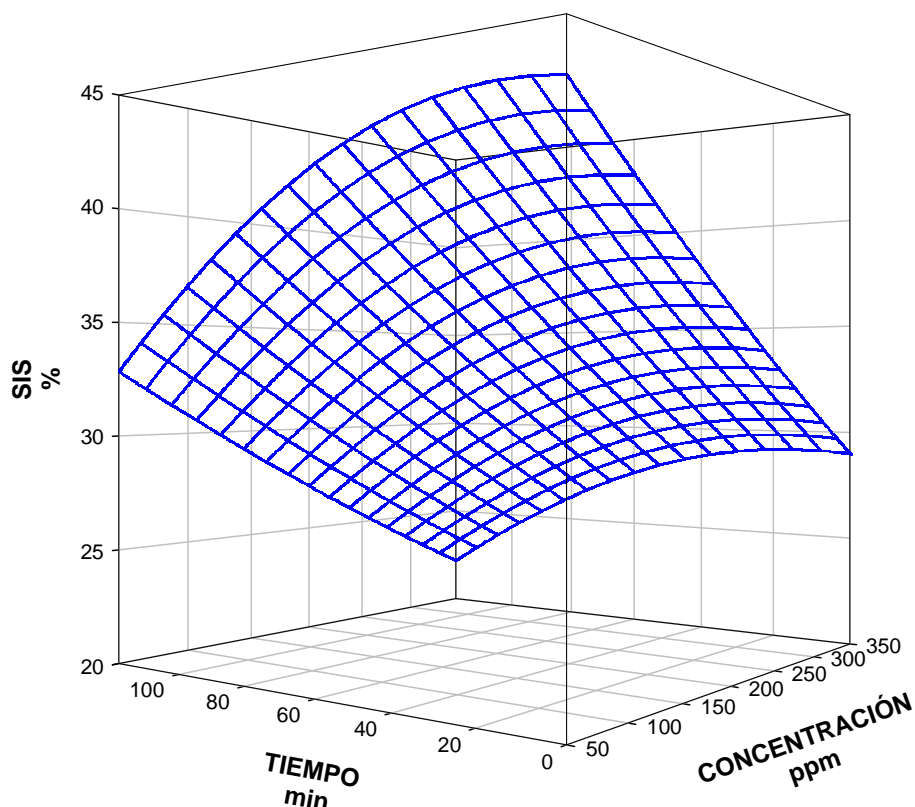


Figura 24. Superficie de respuesta del contenido de SIS para los tratamientos

En la figura 26, se presenta la superficie de respuesta de la solubilización en función de los tratamientos. En la relación de la solubilización, con la concentración del cóctel y el tiempo del tratamiento enzimático, existe un espacio que simboliza la mayor solubilización para luego disminuir. Esto significa que al aumentar la concentración y el tiempo del tratamiento enzimático, no existió mayor solubilización, debido a que las actividades enzimáticas presentes en el cóctel se agotaron con el sustrato presente en la pared celular de la pulpa.

La ecuación que relaciona la concentración del cóctel enzimático (y), el tiempo del tratamiento enzimático (x) y la solubilización (z_1), calculados en la pulpa de arazá con un R^2 de 0,76 fue la siguiente:

$$z_1 = 59,0928 * \exp(-0,5 * (((x - 283,222/197,206)^2 + ((y - 216,652)/221,889)^2)))$$

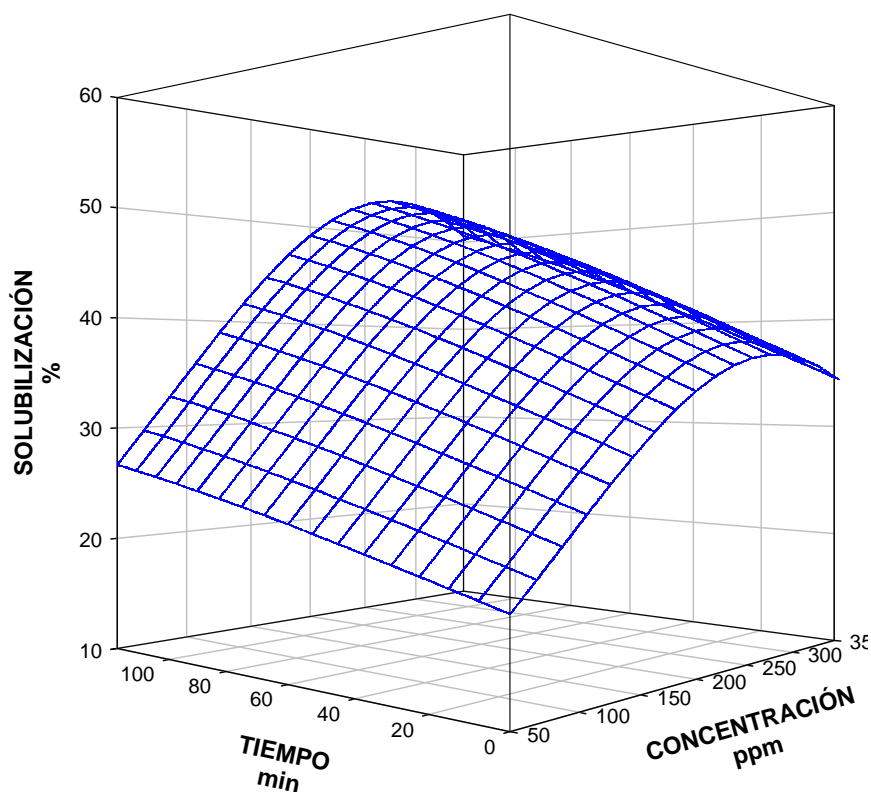


Figura 25. Superficie de respuesta de la solubilización para los tratamientos

En la figura 27, se presenta la superficie de respuesta para la consistencia en función de la concentración del cóctel enzimático y del tiempo del tratamiento enzimático. La consistencia de la pulpa de arazá presenta una relación directa con la solubilización de la pulpa. Es la variable que mejor se relaciona con los resultados de los tratamientos, el cual se obtuvo una correlación de 0,90 para la ecuación de la superficie de respuesta.

La ecuación que relaciona la concentración del cóctel enzimático (y), el tiempo del tratamiento enzimático (x) y la consistencia (z_2), calculados en la pulpa de arazá con un R^2 de 0,90 fue la siguiente:

$$z_2 = 92,4202 * \exp(-0,5 * (((x - 3643,61)/(-1924,34))^2 + ((y - 129,715)/197,937)^2))$$

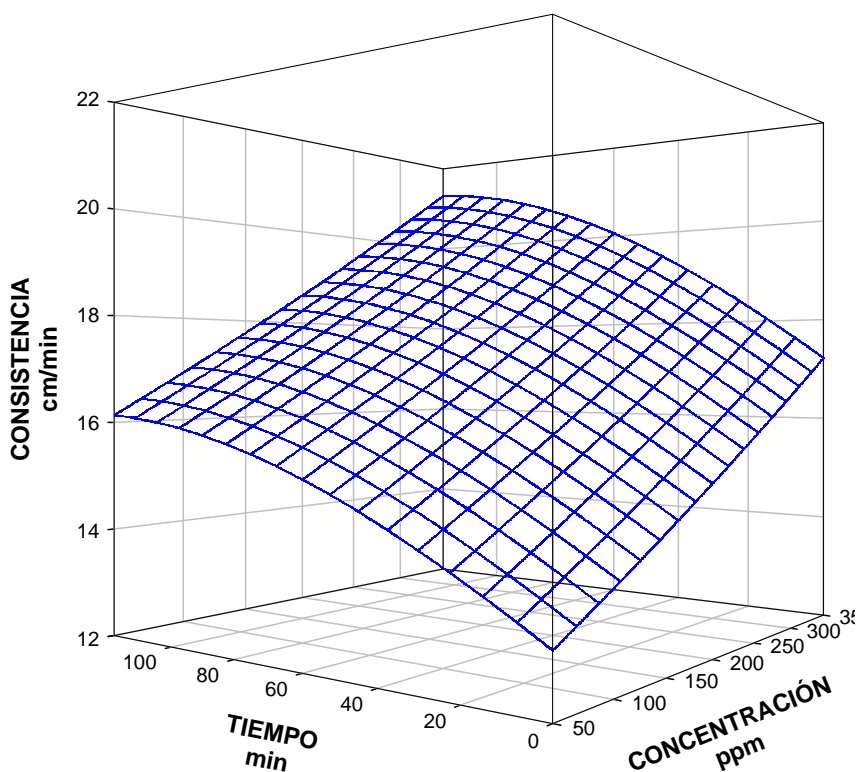


Figura 26. Superficie de respuesta para la consistencia en cada tratamiento

En la figura 28, se presenta la superficie de respuesta para la viscosidad cinemática, obtenida en el sobrenadante de la centrifugación, con la concentración del cóctel y el tiempo del tratamiento enzimático.

La ecuación que relaciona la concentración del cóctel enzimático (y), el tiempo del tratamiento enzimático (x) y la viscosidad cinemática (z_3), obtenida con el sobrenadante de la centrifugación cuando se realizó el análisis de los sólidos solubles en suspensión, se obtuvo un R^2 de 0,90 y fue la siguiente:

$$z_3 = 52,8367 * \exp(-0,5 * (((x - (-1859,67))/859,831)^2 + ((y - (-290,391))/282,537)^2))$$

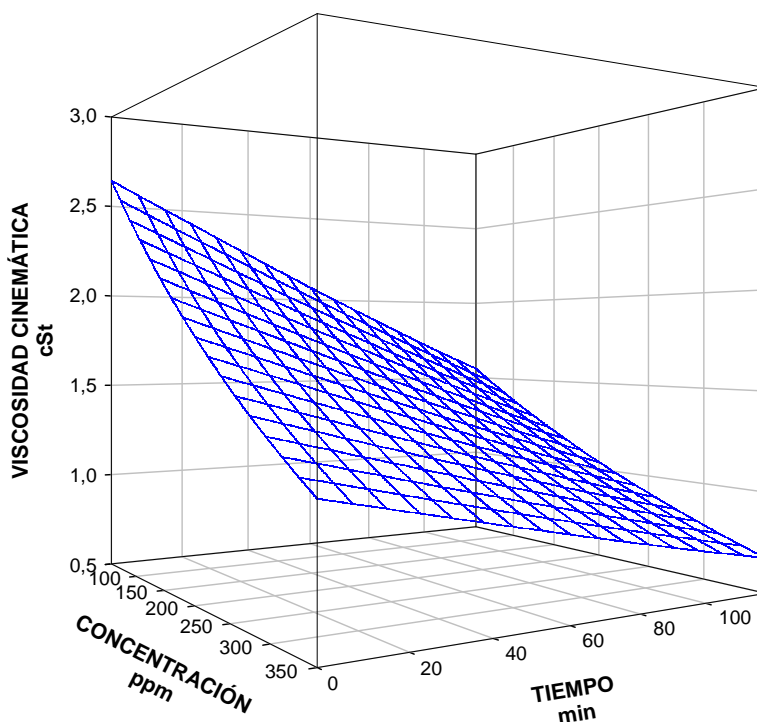


Figura 27. Superficie de respuesta de la viscosidad cinemática para cada tratamiento

La tendencia de la viscosidad cinemática disminuyó conforme la concentración y el tiempo de enzimación aumentó, caso similar al obtenido para la figura de los sólidos insolubles en suspensión.

En la figura 29, se presenta la superficie de respuesta para la viscosidad dinámica, obtenida para las pulpas tratadas enzimáticamente, de los 10 tratamientos. En los resultados obtenidos se obtuvo la ecuación de Guassiana con una correlación R^2 de 0,82, no se reporta la ecuación que representa al gráfico, ya que no se confirmaron los resultados experimentales, razón por la cual no ofrecía una confiabilidad para esta variable de control.

Del análisis estadístico, se observa que la concentración es el parámetro de mayor influencia en la viscosidad dinámica.

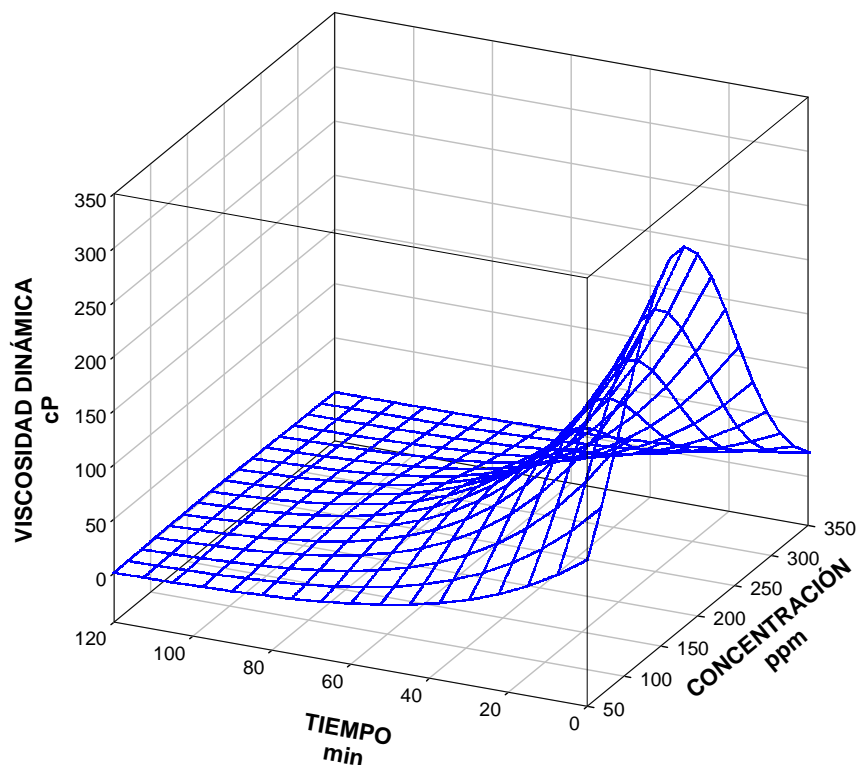


Figura 28. Superficie de respuesta de la viscosidad dinámica para cada tratamiento

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO EN LA MFT PARA LA OBTENCIÓN DE LOS MEJORES RENDIMIENTOS DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ

3.3.1 DETERMINACIÓN DE LA PTM ÓPTIMA

Para la selección de la *PTM* se realizaron los ensayos para las presiones de 1, 2, y 3 bar, con un *FRV* de 1 y en modo de recirculación. Los resultados correspondientes al efecto de la *PTM* sobre el flujo del permeado por unidad de área de la membrana (J_p) se presentan en la figura 30.

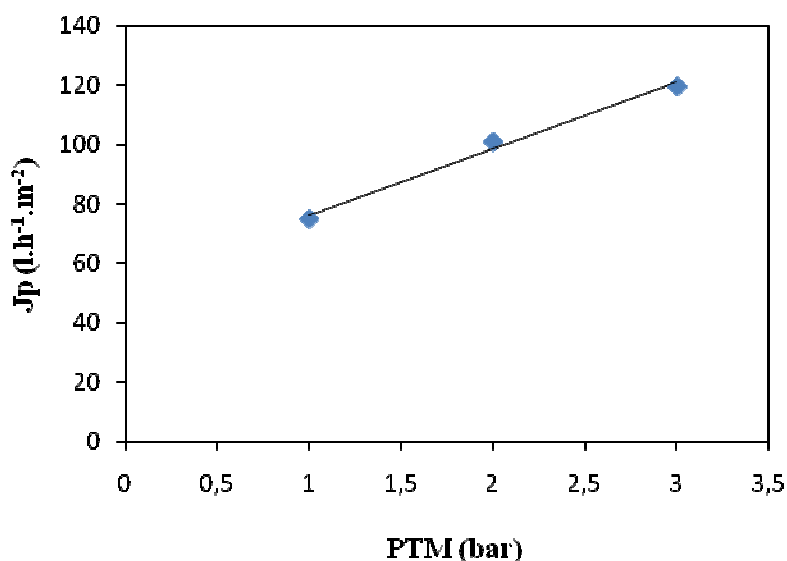


Figura 29. Efecto de la presión transmembranaria sobre el flujo del permeado

Se obtuvo una correlación con un R^2 de 0,99 en la ecuación lineal que relaciona la *PTM* con el J_p y es la siguiente:

$$J_p = 22,345PTM + 53,87$$

Existe una relación lineal entre el flujo del permeado con la presión transmembranaria. En el caso en la pulpa refinada y enzimada de arazá, con una *PTM* de 2 bar se obtuvo un J_p de 101,03 l.h⁻¹.m⁻², en comparación al J_p de 122 l.h⁻¹.m⁻² es un 17 % menor al obtenido por Picho, en el 2008, para granadilla a la misma presión. Por lo expuesto y por la relación que existe entre la *PTM* y J_p , se seleccionó la *PTM* de 3 bar que proporcionó un J_p de 120 l.h⁻¹.m⁻².

3.3.2 DETERMINACIÓN DEL FLUJO DEL PERMEADO (J_p) Y DEL FRV ÓPTIMOS

Los resultados del flujo del permeado y del factor de reducción volumétrico en función del tiempo, se obtuvieron con base en los cálculos del volumen del permeado recolectado durante el proceso de microfiltración. Se trabajó con la *PTM* óptima de 3 bar y en modo continuo.

La colmatación de la membrana se produjo a los 40 minutos de iniciado el proceso de microfiltración, como se puede apreciar en la figura 31, y mediante el trabajo en continuo, se alcanzó el valor más alto del *FRV* de 7,13 con un *Jp* de 8,13 l.h⁻¹.m⁻², esto quiere decir que al tiempo señalado decayó totalmente el flujo del permeado por la concentración de las partículas en el retenido, que no pueden atravesar los microporos de la membrana semipermeable del módulo MFT.

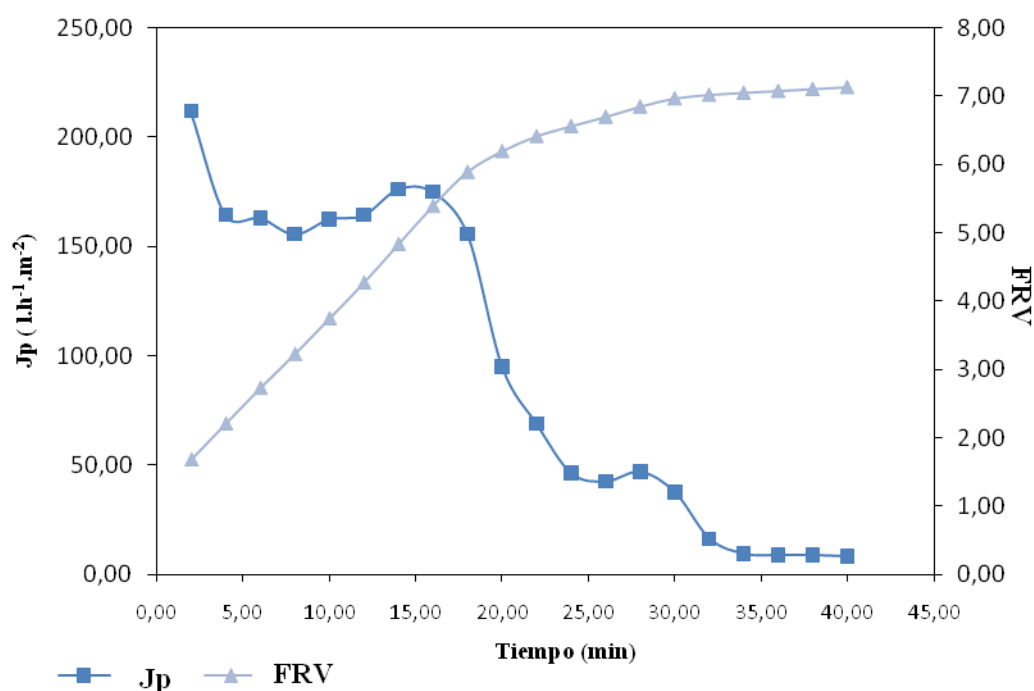


Figura 30. Relación entre *Jp*, *FRV* y el tiempo, a *PTM* de 3 bar

La ecuación polinómica que relaciona el *Jp* en función del tiempo (*x*) del proceso de MFT, con *R*² de 0,98, es la siguiente:

$$Jp = 6e^{-06}x^6 - 0,0009x^5 + 0,0518x^4 - 1,3902x^3 + 17,982x^2 - 102,56x + 359,46$$

La ecuación polinómica que relaciona el *FRV* en función del tiempo (*x*) en el proceso de MFT, con *R*² de 0,99 es la siguiente:

$$FRV = -0,0053x^2 + 0,3657x + 0,7915$$

El tiempo al cual se colmata la membrana, a una *PTM* de 3 bar, sirvió de referencia para no probar a mayores presiones, debido a que si se aumenta la *PTM* aumenta el J_p , pero también disminuye el tiempo del proceso, por la colmatación de la membrana semipermeable.

Las investigaciones realizadas por Badillo, Picho y Mosquera, en el 2008, en uvilla, granadilla y naranjilla, mostraron que la *PTM* óptima encontrada fue de 2,00; 2,00 y 2,65 bar, respectivamente, lo que sirvió como sustento técnico, para trabajar hasta una *PTM* de 3 bar, de esta manera, no se forzó al módulo de MFT con presiones superiores.

La tendencia general del J_p con el tiempo del proceso de MFT, fue decrecer con el tiempo. El flujo que se obtuvo con la pulpa enzimada de arazá presentó una fase estacionaria bien definida a partir de los 25 minutos para la *PTM*, de 1, 2 y 3 bar como muestra la figura 32.

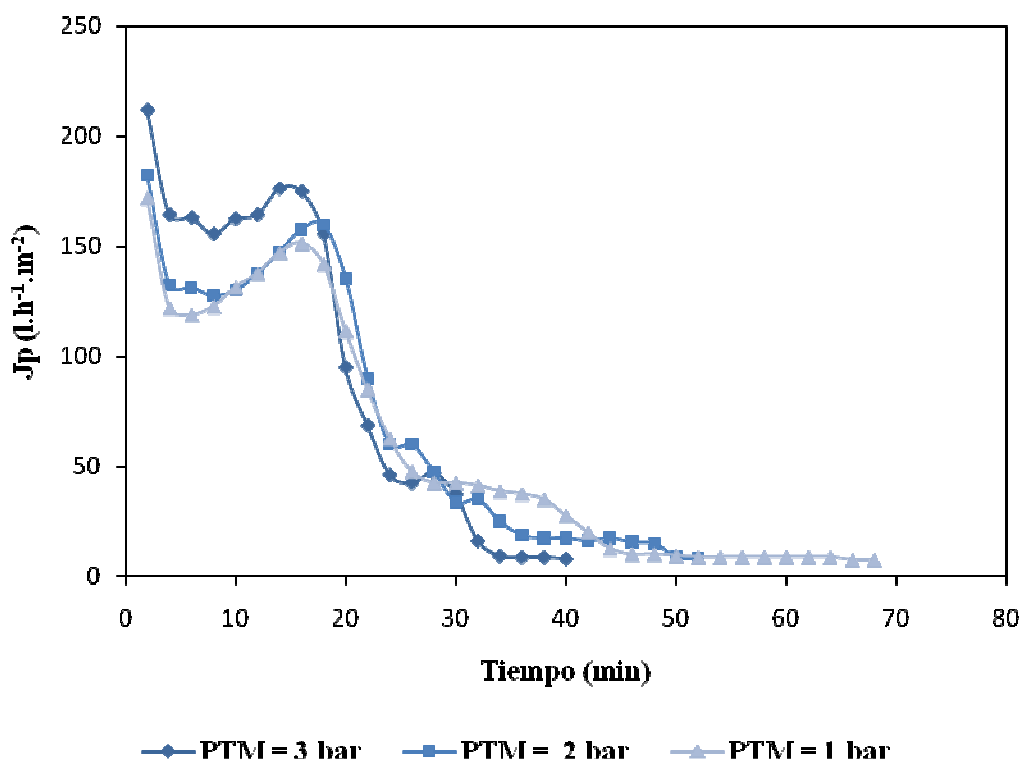


Figura 31. Comportamiento del J_p a tres valores *PTM*

La tendencia similar de los flujos en las presiones transmembranarias de 1, 2 y 3 bar, se debe al aumento de la concentración de los componentes de mayor peso molecular en la parte inicial del proceso, en el cual, se presenta una estacionalidad entre los 4 y 10 minutos, la misma que se debe al equilibrio dinámico alcanzado por el flujo convectivo y el flujo difusivo de los componentes presentes en la pulpa de arazá. Luego se presentó un aumento del flujo entre los 10 y 20 minutos, debido al aumento del transporte convectivo del fluido, sometido por la constante alimentación de la pulpa, hasta que empezó a disminuir el J_p y la membrana comenzó su colmataje hasta llegar a la estacionalidad a partir de los 32 minutos en los tres valores de PTM ensayados.

Villareal, en 1999, desde el punto de vista industrial recomienda trabajar con un J_p mayor a $40 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. En la pulpa de arazá tratada enzimáticamente se alcanzó un J_p de $175 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ con un FRV de 5,39, a los 16 minutos, con 3 bar de PTM , los cuales se convirtieron en los parámetros óptimos elegidos. Al comparar estos resultados a los obtenidos por Badillo, en el 2008, en la pulpa enzimada de uvilla a una PTM de 2 bar, el FRV de 4,6 a los 36,8 minutos obtuvo un J_p de $45 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

Se determinó el flujo del retenido mediante el uso de las siguientes ecuaciones:

$$F_a = F_r + F_p \quad [9]$$

Donde: F_a : flujo de alimentación (l.h^{-1})
 F_r : flujo de retenido (l.h^{-1})
 F_p : flujo de retenido (l.h^{-1})

El FRV descrito en el capítulo uno también se puede definir de la siguiente manera

$$FRV = \frac{F_a}{(F_a - F_p)} \quad [10]$$

Al reemplazar la Ec. 9 y 10 en la Ec. 11 se puede deducir la siguiente fórmula:

$$Fr = \frac{Fp}{(FRV - 1)} \quad [11]$$

En la ecuación 11 se reemplazó los valores óptimos seleccionados de Fp y FRV , en el que se obtuvo el flujo del retenido de $39,86 \text{ l.h}^{-1}$. Esto significa, que se necesita retirar este valor de Fr para mantener el módulo en un sistema continuo y de esta forma impedir que se colmate la membrana.

Entre el Jp y el FRV existe una relación inversamente proporcional, esto quiere decir que a mayor FRV se obtiene un menor flujo del permeado por unidad del área de la membrana, que se presenta en la figura 33.

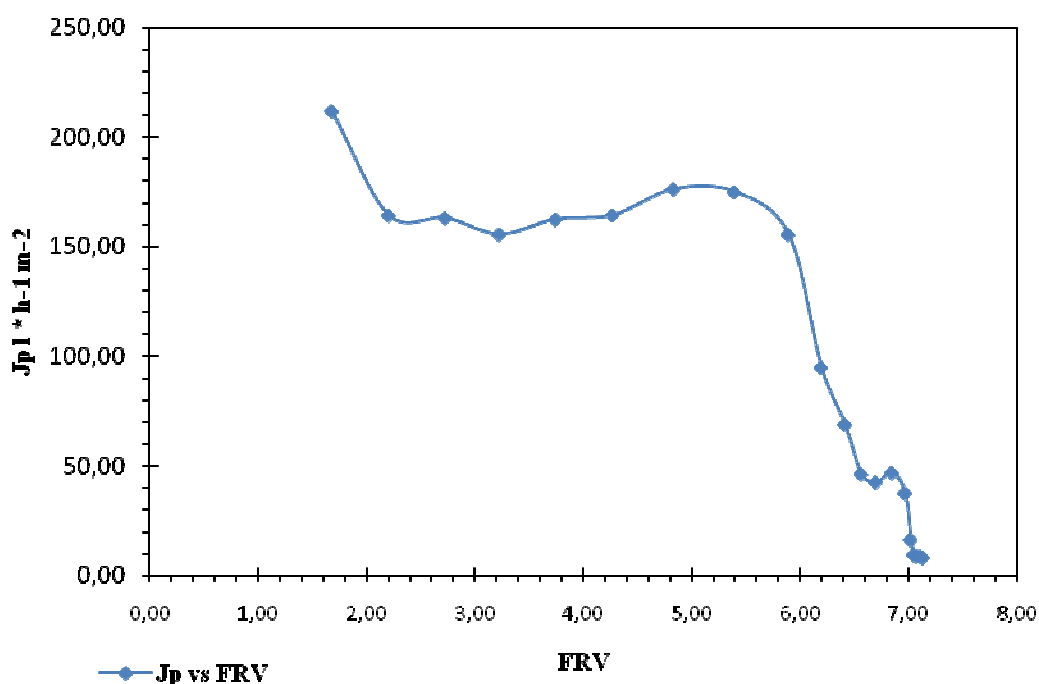


Figura 32. Relación entre el Jp y el FRV , en la pulpa de arazá con tratamiento enzimático

El Jp disminuye, mientras el FRV aumenta, efecto que es causado por el contenido de sólidos insolubles en suspensión que tiene la pulpa enzimada y refinada de arazá. Este comportamiento es similar al obtenido en otras frutas, como el maracuyá, uvilla, mora, granadilla y naranjilla, resultado que la industria

de alimentos debe asimilar y controlar con el procedimiento adecuado. En el caso del arazá, al inicio del proceso de MFT (2 minutos) cuando el FRV es de 1,68 el J_p es de $211,88 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ y al final del proceso (40 minutos) con el FRV de 7,13 se obtuvo el J_p de $8,13 \text{ l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

La ecuación siguiente, es la que relaciona el flujo del permeado por área de la membrana (J_p) en función del factor de reducción volumétrico (x) del proceso de MFT, con R^2 de 0,98, la cual, sirve para conocer el J_p de acuerdo con los factores de reducción volumétrico que se necesita en la investigación.

$$J_p = 0,4417x^6 - 10,969x^5 + 109,3x^4 - 565,29x^3 + 1620,5x^2 - 2468,6x + 1730,7$$

3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA PTM Y EL FRV

En la figura 34 se presenta la relación entre la PTM y el FRV , con base en los valores promedios de cuatro mediciones del flujo del permeado.

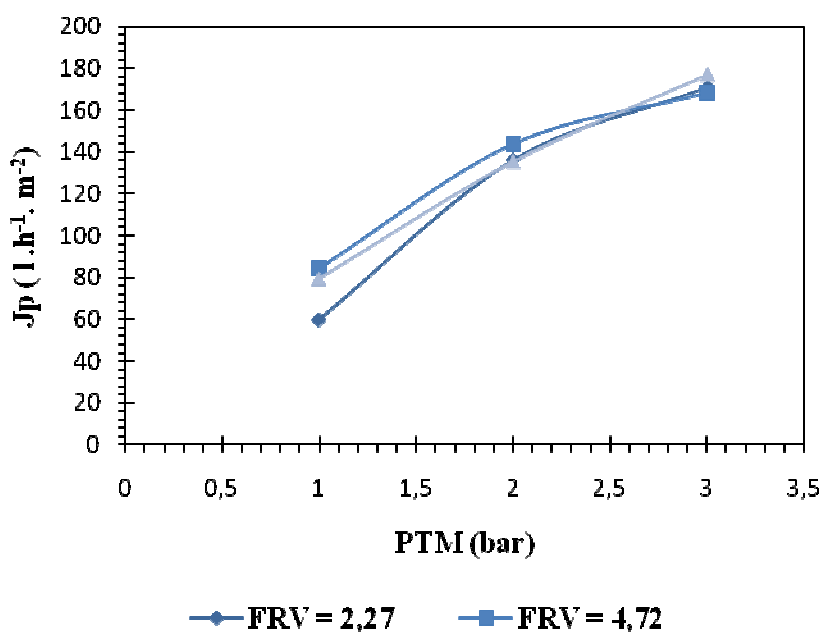


Figura 33. Relación de la PTM y el J_p , a tres FRV en la pulpa enzimada de arazá

Los valores de J_p obtenidos con diferentes cantidades de FRV y PTM muestran la misma tendencia. Esto quiere decir que, sin importar el FRV con el que se trabajó, siempre aumentará el flujo del permeado por unidad de área de la membrana. Se puede verificar que el FRV de 6,27 con relación a los obtenidos de 4,72 y 2,27, existe un aumento del J_p del 23,5 % y 55,12 %, respectivamente, lo que demostró que la variable que más influye en el flujo es la PTM .

Con el primer valor de FRV de 2,27 mediante el análisis estadístico muestra que la menos uno de los tres niveles de la PTM presenta una variación estadísticamente significativa $\alpha = 0,05$ %.

En la tabla 16 se detalla los resultados con un FRV de 2,27 y a los diferentes niveles de PTM , los que presentan diferencias significativas, esto significa que existe una variación significativa del J_p , al aplicar cualquiera de los niveles de PTM a un FRV constante.

Tabla 16. Pruebas de significación de Tukey al 5 %, a un FRV de 2,27

PTM (bar)	RÉPLICAS	MEDIAS DE J_p	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1	4	60,00 \pm 2,041	A
2	4	136,25 \pm 1,443	B
3	4	170,94 \pm 2,772	C

También se determinó que con un FRV de 4,72 existe una variación estadísticamente significativa en al menos uno de los niveles de PTM a otro, con α de 0,05 %.

La tabla 17 muestra los resultados obtenidos del análisis estadístico, la que demuestra que si se varía uno de los niveles de la PTM , también varían los valores correspondientes a los J_p , que significa que existe una diferencia significativa entre cada nivel a un mismo valor de FRV , por lo que se clasifica en 3 grupos homogéneos distintos.

Tabla 17. Pruebas de significación de Tukey al 5 %, a un *FRV* de 4,72

PTM (bar)	RÉPLICAS	MEDIAS DE J_p	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1	4	84,38 ± 1,250	A
2	4	142,75 ± 2,500	B
3	4	168,13 ± 3,146	C

Finalmente, con un *FRV* de 6,27, al menos uno de los niveles de *PTM* presenta una variación estadísticamente significativa con α de 0,05 %.

Para un *FRV* de 6,27 de acuerdo con el análisis estadístico la tabla 18 presenta los resultados obtenidos, en donde se comprueba una vez más, que existe la presencia de grupos homogéneos de acuerdo con cada nivel de la *PTM*, así mismo como la existencia de diferencias significativas entre los valores de J_p para cada *PTM*.

Tabla 18. Pruebas de significación de Tukey al 5 %, a un *FRV* de 6,27

PTM (bar)	RÉPLICAS	MEDIAS DE J_p	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1	4	79,38 ± 1,250	A
2	4	135,31 ± 2,135	B
3	4	176,88 ± 3,750	C

Los resultados obtenidos, producto del análisis estadístico con los tres valores de *FRV*, demostraron que existen diferencias significativas entre los niveles de *PTM* con respecto a los valores obtenidos de J_p , esto quiere decir que al trabajar con el *FRV* máximo o mínimo siempre va a existir mayor J_p de acuerdo con la *PTM* con la que se trabaje. De lo cual se deduce que la *PTM* está íntimamente relacionada con el J_p , más no con el *FRV*, en el caso de trabajar con pulpa refinada y enzimada de arazá.

De acuerdo con los resultados presentados por Badillo, en el 2008, muestran que en la pulpa de uvilla existe la presencia de diferentes grupos homogéneos únicamente cuando el *FRV* es bajo (4,6), ya que para *FRV* superiores (6,3 y 7,3) el efecto en los valores de *Jp* disminuyó partir de 1,5 bar; a diferencia con el arazá, que presentó diferentes grupos homogéneos con los 3 valores de *FRV*, en cada nivel de *PTM* y, consecuentemente distintas cantidades de *Jp*.

3.3.4 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ EN LA MFT

El rendimiento obtenido para el permeado (jugo clarificado) de arazá, con relación a la fruta entera, es de 45,49 %; a la pulpa es del 75,82 % y del 90,71 % con relación a la pulpa refinada, valor que es alto comparado al obtenido por Picho, en el 2008, del 50 % en el rendimiento del permeado en la pulpa de granadilla, y similar al obtenido por Mosquera, en el 2008, con 78,2 % en la pulpa de naranjilla.

Los rendimientos del proceso son de vital importancia, debido a que se convierten en una herramienta indispensable para la determinación de los costos para la producción.

En el anexo C se pueden apreciar las fotografías, de las diferentes etapas del proceso para la obtención de jugo clarificado de arazá.

En la figura 35, se presenta el diagrama de flujo para la obtención del jugo clarificado de arazá procesado en el módulo de microfiltración tangencial, desde la recepción de la fruta hasta la obtención del producto, a las condiciones optimizadas en esta investigación.

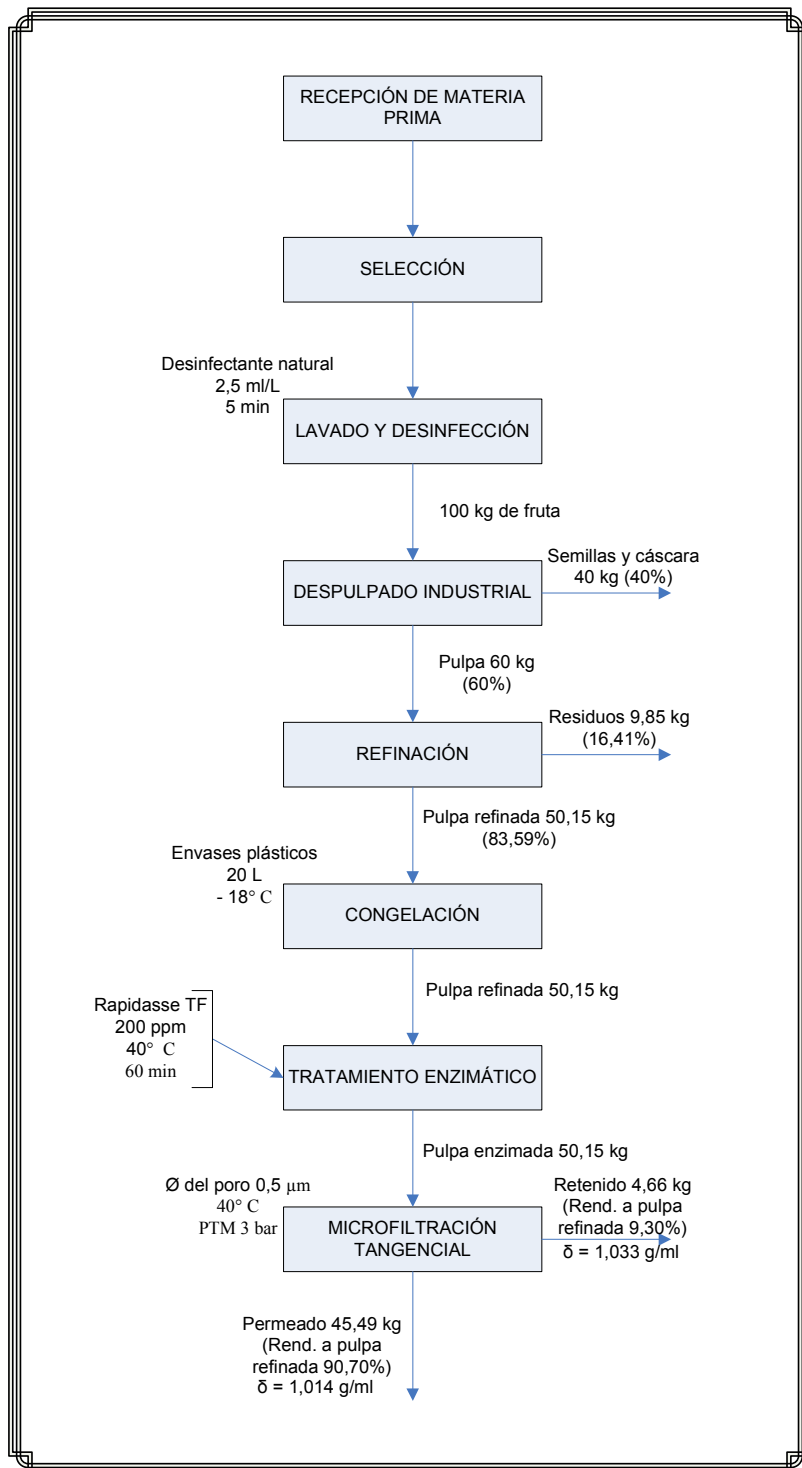


Figura 34. Diagrama de flujo del proceso optimizado, para la obtención de jugo clarificado de arazá

3.3.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICA-QUÍMICA Y NUTRICIONAL DEL PERMEADO Y RETENIDO DE ARAZÁ

En la tabla 19 se presenta los resultados de los análisis físicos y químicos de los distintos productos obtenidos durante el procesamiento de la fruta del arazá a las condiciones óptimas.

Tabla 19. Caracterización física-química de diferentes productos de arazá

PRODUCTOS DE ARAZÁ *	SÓLIDOS INSOLUBLES EN SUSPENSIÓN (%)	SÓLIDOS SOLUBLES ° Brix	pH	TURBIDEZ (NTU)	VISCOSIDAD CINEMÁTICA (cSt)	VISCOSIDAD DINÁMICA ** (cP)
Pulpa	46,52±0,40	4,40±0,57	2,79±0,01	12.666,67±288,68	5,89	550,00
Pulpa enzimada	30,84±0,36	4,40±0,75	2,79±0,01	8.944,45±254,59	1,20	50,00
Permeado	ND	5,33±0,12	2,67±0,02	< 10	0,97	ND
Retenido	52,92±1,00	9,00±1,00	2,74±0,11	73.666,67±577,35	ND	1.325,00

* En base fresca ± desviación estándar, n = 3 repeticiones

** 50 rpm, 25° C, spindle 14

ND: no determinado

Los sólidos insolubles en suspensión en la pulpa enzimada, a las condiciones optimizadas con el cóctel comercial Rapidasa TF, fue del 30,84 %, el cual se obtuvo el 33,58 % de solubilización, con relación a la pulpa. El aumento de los SIS, del 52,92 % en el retenido, se debe a la alta concentración de macromoléculas que no se filtraron en el proceso y que se concentraron en la MFT.

La pulpa de arazá se caracteriza por tener bajo contenido de sólidos solubles, con 4,40° Brix, evidenciado un aumento notable en el permeado y el retenido obtenidos de la MFT con valores de 5,33 y 9,00° Brix, esto significa un incremento en el 18 % y 51 %, respectivamente. Con relación al estudio realizado en maracuyá por Villarreal, en 1999, muestra que no existe una variación estadísticamente significativa, con valores de 15,20 y 15,90° Brix en el permeado y retenido, respectivamente, similar a los resultados obtenidos en los estudios realizados por Badillo y Picho, en el 2008.

Con respecto al pH no existe un notable cambio en ninguno de los productos. En la turbidez existe una relación similar junto con los demás análisis discutidos anteriormente, donde el mayor valor es el del retenido con 73 666,67 NTU, seguido de la pulpa con 12 666,67 NTU y la pulpa enzimada con 8 833,33 NTU, valor que es 1,4 veces menor frente a la pulpa y 8 veces menor con respecto al retenido; en el permeado el valor es menor a 10, de acuerdo con la sensibilidad del equipo en que se realizó la medición.

La viscosidad cinemática presentó valores en la pulpa de 5,89 cSt, que disminuyó a 1,20 cSt luego del tratamiento enzimático y en 0,97 cSt en el permeado obtenido del proceso de MFT, en el retenido no se pudieron tomar las lecturas en el equipo. Este parámetro controla el efecto de la solubilización de la pared celular (tecnología enzimática) y la filtración de partículas menores a 0,5 μm en el permeado (tecnología de separación por membranas).

En la viscosidad dinámica se obtuvieron valores en la pulpa de 550 cP, que disminuyó en la pulpa enzimada a 50 cP, y se aumento en el retenido con 1325 cP. De igual manera que en la viscosidad cinemática, el efecto del tratamiento enzimático y membranario, se refleja en los valores obtenidos. En el permeado no se detectó la viscosidad en el viscosímetro programable Brookfield modelo DV-II+ a pesar de haber utilizado el acaparador para muestras con valores de bajas lecturas.

En la tabla 20, se muestra los parámetros medidos para el color (L, a, b) y los calculados ($^{\circ}$ H, C, IO), en cada uno de los productos del proceso enzimático y de membranas para el arazá.

Tabla 20. Resultados de la medición de color para diferentes productos de arazá

PRODUCTOS DE ARAZÁ	COLOR					
	L	a	b	$^{\circ}$ H	C	IO
Pulpa	51,93 \pm 0,781	-2,46 \pm 0,101	26,50 \pm 0,921	-84,68 \pm 0,241	26,63 \pm 0,882	64,58 \pm 2,651
Pulpa enzimada	50,45 \pm 0,971	-2,34 \pm 0,481	26,45 \pm 1,100	-84,94 \pm 0,572	26,55 \pm 0,991	66,18 \pm 3,041
Permeado	29,78 \pm 1,734	-2,52 \pm 0,845	5,88 \pm 1,694	-66,90 \pm 2,689	6,40 \pm 1,870	11,44 \pm 2,522
Retenido	58,60 \pm 0,325	-2,25 \pm 0,175	39,08 \pm 1,111	-86,70 \pm 0,258	39,14 \pm 1,111	96,37 \pm 3,736

* En base fresca \pm desviación estándar, n = 3 repeticiones
a+ = rojo, a- = verde, b+ = amarillo, b- = azul

Se puede verificar que los resultados de las coordenadas colorimétricas *a* y *b* determinan una coloración amarilla verdosa para los cuatro productos de arazá, pero sin diferencias significativas en los datos para la pulpa sin y con tratamiento enzimático. La intensidad del color amarillo en el permeado disminuye y aumenta en el retenido, con la misma intensidad en el tono verde. Los parámetros luminosidad (L), cromaticidad (C) e índice de oscurecimiento (IO) tienen igual tendencia con valores parecidos en la pulpa sin y con tratamiento enzimático, que disminuye en el permeado y se incrementa en el retenido de arazá.

La cromaticidad reporta la intensidad del color, los valores más altos significan que el color es más puro, como es el caso del valor de 39,14 obtenido para el retenido de arazá.

En la tabla 21, se presenta la composición nutricional del permeado y retenido obtenido en el proceso de MFT, para la pulpa refinada y enzimada de arazá, información importante para la promoción y la hoja técnica de estos dos productos.

Tabla 21. Composición nutricional del permeado y retenido de arazá, obtenidos del proceso de MFT, en base fresca

ANÁLISIS*			MUESTRAS DE ARAZÁ	
			JUGO CLARIFICADO (PERMEADO)	CONCENTRADO (RETENIDO)
Vitamina C (mg/100 ml)			14,50 ± 0,25	54,76 ± 0,80
Minerales	Macro elementos (mg/100ml)	Calcio	6,63 ± 0,20	6,82 ± 0,51
		Magnesio	3,53 ± 0,10	6,82 ± 0,01
		Sodio	0,22 ± 0,09	0,62 ± 0,11
		Potasio	40,33 ± 0,07	47,11 ± 1,01
		Fósforo	6,13 ± 0,40	14,26 ± 1,19
	Micro elementos (µg/100 ml)	Cobre	34,00 ± 2,00	50,00 ± 0,20
		Hierro	131,00 ± 0,95	248,00 ± 1,01
		Manganeso	40,00 ± 1,30	50,00 ± 0,13
Zinc		110,00 ± 1,05	136,00 ± 0,12	
Azúcares totales (g/ 100 ml)			4,02 ± 0,04	4,98 ± 0,21
Azúcares reductores (g/ 100 ml)			2,88 ± 0,03	4,87 ± 0,02
Polifenoles totales (mg/ 100 ml)			52,66 ± 0,20	62,22 ± 0,63
Carotenoides totales (mg/100 ml)			0,28 ± 0,07	0,47 ± 0,04

* En base fresca ± desviación estándar, n = 3 repeticiones

El retenido producto de la MFT es aquel que posee en mayor cantidad en todos los componentes nutricionales, especialmente la vitamina C que es 4 veces mayor, el magnesio, el fósforo, el hierro y los azúcares reductores son 2 veces mayor comparado con el jugo clarificado, por la concentración de moléculas en esta etapa del proceso.

Para el contenido nutricional del retenido o concentrado de arazá, tiene que ser sometido a un proceso de pasteurización, debido a que la flora microbiana se encuentra en este producto y puede ser aplicado en el desarrollo de diferentes productos en la industria de alimentos.

3.3.6 ANÁLISIS SENSORIAL DEL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ

Se comparó la calidad sensorial del jugo clarificado y de la pulpa de arazá, con el uso de una prueba de preferencia con 30 catadores no entrenados, cuyos resultados se presentan en la tabla 22.

La muestra poblacional estuvo representada por las 120 personas que forman parte del área técnica y administrativa de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, se seleccionaron las personas que se encontraban en edades de entre 20 a 35 años, como los futuros consumidores para el jugo clarificado que no se encuentra todavía en el mercado y que son catalogados como catadores no entrenados.

Tabla 22. Resultados de la prueba sensorial de preferencia para los jugos de arazá

PRODUCTOS DE ARAZÁ	NÚMERO DE PANELISTAS*	GRADO DE PREFERENCIA (%)
Jugo Clarificado	10,00	33,33
Jugo Pulposo	17,00	56,67
Los dos jugos	3,00	10,00

* n = 30 catadores no entrenados

Como se puede apreciar, el grado de preferencia para el jugo pulposo de arazá es del 56,57 % y para el jugo clarificado del 33,33 %. Al 10 % de los catadores les gustó los dos jugos.

El análisis estadístico para establecer la diferencia significativa en los resultados obtenidos, se utilizó la probabilidad de que alguno o más juicios sean correctos en algunas pruebas ($p = 1/3$) de tal forma que, para los 17 panelistas que prefirieron

el jugo pulposo de entre los 30, al comparar con la probabilidad del 5 % de error (0,05) se obtuvo un valor de 0,007, de acuerdo con la tabla, que se muestra en el anexo E. El dato obtenido al ser menor, determina que existe una diferencia significativa en el número de panelistas que notan la diferencia.

Los resultados demostraron que el número de catadores que prefirieron el jugo clarificado, eran personas en una rango de edades de entre 20 a 29 años que escogieron la bebida no muy viscosa y sobretodo refrescante. En cambio, las personas que eligieron el jugo pulposo se encontraron en un rango de edad de entre 29 a 35 años que prefirieron una bebida viscosa, esto significa que los catadores se guiaron más por la apariencia del jugo más no en el sabor de acuerdo con los comentarios expresados en la encuesta.

También es claro identificar la tendencia del consumo de bebidas refrescantes y sobre todo no muy viscosas, por personas en edad inferior a los 30 años, ya que son aquellas con un grado de preferencia superior por productos innovadores, caso distinto sucede con las personas que prefirieron el jugo pulposo. Esto se debe, principalmente, por la apariencia de la bebida y la costumbre de consumir jugos más viscosos que se parecen más a los de la fruta.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- El rendimiento obtenido en la caracterización de la pared celular del arazá fue de 1,24 % de pared celular bruta a pulpa fresca, 94,05 % de pared celular purificada a pared celular bruta y 5,95 % de pectina soluble en agua a pared celular bruta, que muestra para esta fruta un alto contenido de polisacáridos en la pared celular y un bajo contenido de pectina.
- La caracterización de la pared celular presentó la siguiente composición: celulosa con 24,55 %, pectina insoluble 23,64 %, lignina 17,94 %, proteína 15,92 %, almidón 3,49 % y cenizas 3,28 %.
- La pectina soluble en agua de la pulpa de arazá tiene 41,63 % de grado de esterificación, que se clasifica como pectina débilmente metiladas, tecnológicamente importante, ya que puede formar geles termo reversible en presencia de ciertos iones metálicos divalentes, como el calcio. El cual se confirma la costumbre del consumo de arazá como batidos con leche, ya sea por el sabor o la consistencia semejante a la del yogurt.
- El análisis sensorial determinó que la temperatura del tratamiento enzimático óptimo es de 40° C, razón por la cual, la pulpa de arazá al someterse a un proceso térmico hasta la temperatura seleccionada, no presentó cambios en sus propiedades organolépticas.
- El tratamiento seleccionado de entre siete cócteles enzimáticos comerciales es la Rapidase TF a 40° C, 200 ppm y 60 min, condiciones a las cuales tiene el menor contenido de SIS (26,31 %) y la más alta solubilidad (43,44 %). Las ecuaciones obtenidas para las superficies de respuestas, con cada variable de

control, verifica que tanto la concentración como el tiempo, intervienen de forma directa para la solubilización de la pulpa refinada de arazá.

- En la MFT se determinó que existe una relación directamente proporcional entre el J_p y la PTM , mientras que, entre el J_p y el FRV , la relación es inversamente proporcional, razón por la cual, la colmatación de la membrana se produjo a los 40 minutos del proceso de microfiltración.
- Las condiciones óptimas de la MFT, con la pulpa refinada y enzimada de arazá son: PTM de 3 bar, J_p $175 \text{ l.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, FRV 5,39 y Fr de $39,86 \text{ l.h}^{-1}$.
- El rendimiento obtenido de jugo clarificado de arazá a fruta, a pulpa enzimada y a pulpa refinada es de 45,49 %, 75,82 % y 90,71 %, respectivamente, valores interesantes desde el punto de vista industrial.
- La tendencia del flujo del permeado por unidad de área de la membrana que se obtuvo con la pulpa enzimada de arazá, no presenta una fase estacionaria bien definida, como las obtenidas en otras frutas, como la uvilla, la granadilla, la naranjilla, entre otras. Únicamente se puede visualizar una ligera estacionalidad al inicio y al final del proceso.
- De acuerdo con la caracterización física, química y nutricional del permeado y retenido de arazá, existe un aumento en los valores del retenido, el que se debe a la concentración de las partículas que no se microfiltraron por la membrana. Los sólidos solubles se incrementan de $5,33^\circ \text{Brix}$ a $9,00^\circ \text{Brix}$; los parámetros L, b, C, IO, se incrementan 49 %, 85 %, 84 % y 88 %; los azúcares totales, en un 19 % y la vitamina C, en 74 %, principalmente.
- Los catadores en edades comprendidas entre los 20 a 29 años, escogieron una bebida poco viscosa y sobretodo refrescante, en cambio las personas que eligieron el jugo pulposo se encontraron en un rango de edad entre los 29 a 35

años, que prefirieron una bebida viscosa, más parecida a la fruta. Lo importante es que el sabor de un jugo de fruta, que no se comercializa en el mercado, tuvo preferencia por parte de los consumidores.

4.2 RECOMENDACIONES

- Probar la centrifugación, como una alternativa adicional anterior al tratamiento enzimático, o un proceso afín, que permita prolongar el tiempo en llegar a la colmatación de la membrana durante el proceso de microfiltración tangencial, debido al alto contenido de microfibrillas celulósicas provenientes de los polisacáridos que posee la fruta.
- Para el lavado del módulo luego del proceso de MFT, se requiere empezar con presiones y temperaturas bajas, para evitar el taponamiento de los canales de la membrana, con la formación de un material celulósico muy duro y que dificulta la limpieza.
- Se recomienda utilizar un reómetro, para medir la viscosidad dinámica en los tratamientos de la solubilización de la pulpa, ya que las mediciones realizadas a bajas revoluciones con el viscosímetro Brookfield, demora en estabilizarse las lecturas.
- Valorizar el retenido, producto de la MFT, para la elaboración de diferentes productos, especialmente por sus características nutricionales.
- En la ejecución de todo el proceso para la obtención de jugo clarificado es importante el cumplir con las buenas prácticas de manufactura y de sanidad alimentaria, para asegurar la inocuidad del producto.
- En la actualidad existe una gran tendencia por el consumo de sabores

exóticos y naturales, sin adición de sustancias químicas, por tal motivo, el jugo clarificado de arazá cumple con las exigencias actuales del mercado. También es clara la identificación por el consumo de bebidas refrescantes y ligeras, que se consigue en forma natural con el uso de auxiliares tecnológicos como son las enzimas y el proceso de pasteurización en frío con las membranas en la microfiltración tangencial.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBERSHEIM, P., 1978, "Concerning the structure and biosynthesis of the primary cell walls of plants", Editorial Manners D.J., University Park Press, Baltimore, Estados Unidos, pp. 127-150.
2. ALVARADO, J. y AGUILERA, J., 2001, "Métodos para medir propiedades físicas e industriales de alimentos", Editorial Acribia, Madrid, España, pp. 157, 329.
3. ALVARADO, J., 1996, "Principios de ingeniería aplicados a alimentos", Ambato, Ecuador, p.p. 185, 182, 201-207.
4. A.O.A.C. (Oficial Methods of Análisis of AOAC internacional), 2007, Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, 18 edición, Arlington, Estados Unidos, s.p.
5. ARTHEY, D. y ASHURST, P., 1997, "Procesado de Frutas", Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.p. 147-148.
6. ASIAIN, L., 1999, "Las técnicas de filtración tangencial y el medio ambiente", www.asiain-asesores.com/rev3/pag31.htm., (Acceso: 02, 2007).
7. ASPINALL, G., 1980, "Chemistry of cell wall polysaccharides. In The biochemistry of plants", Editorial Academic Press, New-York, Estados Unidos, pp. 473-500.
8. BADILLO, M., 2008, "Optimización de los parámetros de operación para la obtención de jugo clarificado de uvilla (*Physalis peruviana* L.) utilizando la microfiltración tangencial", Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, EPN, Quito, Ecuador, pp. 26-27.

9. BARRERA, J. y HERNANDEZ, M., 2004, "Bases Técnicas para el Aprovechamiento Agroindustrial de las Especies Nativas de la Amazonia", 1ra edición, Editora Guadalupe Ltda., Bogotá, Colombia, pp. 11-20.
10. BELITZ, H. y GROSCH, W., 1992, "Química de los alimentos", 2da Edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.p. 105 – 172.
11. BOYER, R., 2000, "Conceptos de Bioquímica", Internacional Thomson Editores S.A., Buenos Aires, Argentina, pp.14-146.
12. BRENNAN, J., 2006, "Manual del procesado de los alimentos", 1era Edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 480 – 509.
13. BRITO, B., 2003, Informe final del proyecto INIAP-PROMSA IQ-CV-077 "Aplicación de nuevas tecnologías agroindustriales para el tratamiento de frutas tropicales y andinas de exportación", Quito-Ecuador, pp. 21 - 24.
14. BRITO, B., 2006, Informe del primer año del proyecto binacional INIAP-Ecuador, CORPOICA-Colombia, FTG 14-03 "Fortalecimiento del manejo poscosecha de frutales exóticos exportables de interés para los países andinos", Quito, Ecuador, pp. 19 – 20.
15. CASP, A. y ABRIL, J., 2003, "Procesos de conservación de alimentos", 2da Edición, Ediciones Mundi - Prensa, Madris, España, pp. 447 - 465.
16. CHACÓN, A., 2006, "Tecnología de Membranas en la Industria Láctea", *Agronomía Mesoamericana*, 17(2):243.
17. CHERYAN, M., 1998, "Ultrafiltration and Microfiltration. Handbook. Lancaster", Editorial Technomic, Pennsylvania, Estados Unidos, p.p. 118, 293.
18. CORPEI, 2005, "Naranjillas, Pitahaya, Arazá y Borojó con Agroquímicos",

http://www.ceaecuador.org/imagesFTP/4740.fichas_Naranja_jilla_pitahaya_ara_za_y_borojo_con_Agroquimicos.pdf, (Enero,2008)

19. COULTATE, T., 1984, "Alimentos. Química de sus componentes", Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 25 – 27, 31 – 32 y 36 – 39.
20. DHUIQUE, C., CARIS, C., OLLITRAULT, P., CURK, F. y AMIOT, M., 2005, "Varietal and Interspecific influence on Micronutrient Contents in Citrus from the Mediterranean Area", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Journal of Agricultural and Food, Chemist, Vol 53, p 214
21. DUBOIS, M., Hamilton J., Repus, P. y Smith, F., 1956, "Coloreometric method for determination of sugar and related substances", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Anal, Chem, pp. 28-300-356.
22. FERREIRA, S. y GENTIL, D., 1999, "Arazá (*Eugenia stipitata*) Cultivo y utilización: Manual técnico", Editorial A&C Impresores, Buenos Aires, Argentina, p.p. 8-65.
23. FICK, K., MCDOWELL, L., MILES, P., WILKINSON, N., FUNK, J. y CONRAD, J., 1979, "Manual de Métodos de Análisis de Minerales para tejidos de planta y animales", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Florida, 2da Edición, Florida, EE.UU., s.p.
24. FONTAGRO, 2008. Informe Final del proyecto binacional INIAP-Ecuador, CORPOICA-Colombia, FTG 14-03 "Fortalecimiento del manejo poscosecha de frutales exóticos exportables de interés para los países andinos", Quito, Ecuador, pp. 60 – 67.

25. GEKAS, V., TRAGARDH, G. y HALLSTROM, B., 1993, "Ultrafiltration membrane performance fundamentals", Department of Food Engineering, Lund University, Swedish foundation for membrane technology, Lund, Suecia, pp. 15-20.
26. GIRARD, B. y FUKUMOTO, L., 2000, "Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages", A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(2):91.
27. GOUPY, J., 1999, "Plans d'expériences pour surfaces de réponse.", Editorial Dunoud, Paris, Francia, p.p. 3, 165-169.
28. GREEN, D. y PERRY, R., 2008, "Perry's chemical engineers' handbook", 8va Edición, Mc-Graw Hill, New York, Estados Unidos.
29. GUADIX, A., 2001, "Producción en Reactores de Membrana de Hidrolizados Enzimáticos de Proteínas Lácteas para Nutrición Enteral.", Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Doctorado en Química, Universidad de Granada, Granada, España, p. 245.
30. HART, M., NG, K. y HUXSOLL, C., 1989, "Microfiltration of enzyme-treated apricot puree", Quality factors of fruits and vegetables: chemistry and technology", Collections ACS Symposium, pp. 357-367.
31. HERNÁNDEZ, M., BARRERA, J. y CARRILLO, M., 2006, "Arazá", Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá, Colombia, p. 13.
32. HOLM, J. y BJORCK, N., 1986, "Método adaptado en los Laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP", Asp. Starch 38. 1986. N° 7, S. 224-226, Quito, Ecuador.
33. HUISMAN, I., 1998, "Crossflow microfiltration of particle suspensions. The

- influence of Hidrodynamics and Phyco-chemical Interactions”, Lund University, Lund, Suecia, pp. 15-21.
34. IIAP (Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana) / TCA (Tratado de Cooperación Amazónica) / SPT (Secretaría Pro Tempore), 1997, “Cultivo de Frutales nativos amazónicos”, Manual para el extensionista.
35. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) / MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) / SICA (Sistema de Integración Centroamérica), 2002, “Censo Nacional Agropecuario 3: Resultados Nacionales y Provinciales”.
36. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) / SENACYT (Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología), 2009, Informe del Proyecto (PIC 05-2006-2-002): “Aprovechamiento del potencial nutritivo y funcional de algunas frutas de la amazonía ecuatoriana”: Informe Técnico Final, Quito, Ecuador, p. 8.
37. KAUR, CH. y KAPOOR, H., 2001, “Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health”, International Journal of Food Science and Technology, pp. 36 y 703-725
38. KILARA, A., 1982, “Bocces Biochemistry. Enzymes and their Uses in the Processed Apple Industry”, Station Experiment Agricultural University, Editorial Park. P.A, Estados Unidos, pp.35-36.
39. KLAVONS, J. y BENETT, R., 1986, "Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins", J. Agric. Food Chem, 34: 597-599
40. LARA, J., 2002, “Eliminación de nutrientes mediante procesos de membrana”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Doctor, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España, pp. 21 y 28-32.

41. LEHNINGER, A., 1981, "Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular", 2da Edición, Editorial Pueblo y Educación, Baltimore, Estados Unidos, pp. 98-114
42. MADRID, A., 2001, "Nuevo Manual de Industrias Alimenticias". Tercera edición, Editorial Mundi Prensa, Madrid, España, pp. 72-73 y 314 – 315.
43. Manual ColorTec PCM/PSMTM, adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP.
44. MARCELIN, O., 1992, "Caracterisation des Polysaccharides Parietaux de la Goyave. (Psidium guajava L). Application a L'obtention de nouveaux types de purees par voie enzymatique", L'Universite Montpellier II, Montpellier, Francia, p. 200.
45. MEILGAARD, M., CIVILLE, G. y CARR, B., 1990, "Sensory Evaluation Techniques", 3ra Edición, Editorial CRC Press, Inc., Florida, Estados Unidos, p.59
46. MERCE, S., 2005, "Industria alimentaria, tecnologías emergentes", 1ra edición, Copisteria Mirade, Barcelona, España. pp 173-201
47. MERCK, "Método reflectométrico", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad INIAP.
48. MILLER, G., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Anal, Chem, pp. 31:426-428.
49. MILLAN, P., 2003, "Desarrollo de una preparación enzimática para la licuefacción de los polisacáridos purificados de la pared celular de la mora

- (*Rubís Glaucus Benth*)”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Máster en Ciencia de Alimentos, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, p. 23,29.
50. MONTES, M. y MAGAÑA, I., 2002, “Enzimas con aplicación industrial”, Avance y Perspectiva (XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería). 3(21)279.
51. MOSQUERA, M., 2008, “Evaluación técnica-financiera de la industrialización del jugo clarificado de naranjilla (*Solanum quitoense Lam.*) obtenido mediante microfiltración tangencial”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de ingeniero agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, pp. 49-67
52. OLLE, D., 1997, “Caractérisation des Polysaccharides et des composés Aromatiques de différents cultivars de Mangue (*Mangífera indica* L). Devenir de ces Constituants lors de la Préparation de Concentrés Aromatiques Pulpeux”, Université de Paris, Paris, Francia, p.167.
53. OTERO, J., COLINA, J., LENA, G. y OLVA, F., “Ingeniería de los procesos de filtración con membranas: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI/RO) (IPFM)”, <http://grupos.uncan.es/ipfm/>, Acceso (Julio, 2007).
54. PALACIOS, L., 1999, “Caracterización estructural y superficial de membranas microporosas.”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Doctor en Ciencias Físicas, Universidad de Valladolid, Valladolid, España, pp. 12-14.
55. PICO, L., 2008, “Estudio de las condiciones óptimas de operación de operación para la obtención de jugo clarificado de granadilla (*Pasiflora ligularis* L.) a través de la microfiltración tangencial”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, EPN, Quito, Ecuador, pp. 7-23.

56. PINEDO, P., RAMÍREZ, N. y BLASCO, L., 1981, "Preliminary notes concerning the arazá (*Eugenia stipitata*)", Native Fruit of the Peruvian Amazonia, M.A.A./INIA/IICA, 229(2)sp.
57. PROEXANT, 2005, "Arazá (Amazon Peach)", http://www.proexant.org.ec/HT_Araz%C3%A1.html, (Mayo, 2008).
58. PROEXANT, 2007, "Fortalecimiento del manejo postcosecha de frutales exóticos exportables de interés para los países andinos: Caracterización general en el ámbito interno e internacional", Quito, Ecuador, p. 317.
59. QUEVEDO, G., 1995, "Aspectos agronómicos sobre el cultivo del arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh)", *Agronomía Colombiana*, 12(1), 27.
60. REED, G., 1975, "Enzymes in Food Processing", Editorial Academic Press, Estados Unidos, pp. 17 – 54.
61. RODRÍGUEZ, M., 2002, "Desarrollo de una alternativa tecnológica para la obtención de cremogenados de chirimoya (*Annona cherimola* ;Mill), guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangífera indica*)", Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, ESPOCH, Riobamba, Ecuador, pp. 37-42.
62. ROLAND, J., 1980, "Visualisation des polysaccharides au niveaux ultrastructural. In Les Polymères Végétaux-Polymères Pariétaux et Alimentaires non Azotéz", Editorial Gauthier Villars, Francia, Paris, pp. 30-45.
63. SAAVEDRA, A. y ROMERO, J., 1999, "Aspectos generales sobre procesos y tecnologías de membranas. Curso: Electivo procesos de membranas." Dpto. de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Chile., Santiago de Chile, Chile, pp. 1-7 y 12-14.

64. SAMANIEGO, I., 2003, “Desarrollo de una Alternativa Tecnológica para la obtención de Pulpas tratadas Enzimáticamente de chirimoya (*annona cherimola* mill), guayaba (*psidium guajava* l) y mango (*mangífera indica*)”, Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, ESPOCH, Riobamba, Ecuador, pp. 36 - 43.
65. SCHIRG, P., 2001, “Introducción a la teoría y práctica de las técnicas de membranas”, <http://www.psprozesstechnik.ch>, (Julio, 2009).
66. SINGH, R. y HELDMAN, D., 2001, Introduction to Food Engineering, Third edition, pp.144-161.
67. STEPHANE, G., PIERRE, B., PASCALINE, A. y MARIE, J., 2005, “Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant – Derived Products”, Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Journal of Agricultural and Food, Chemis, Vol. 53, pp. 1370 -1373
68. TECAN SCHWEIZ AG, 2002, “Application Manual for MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Robot-96. Plasmid Kit automated on the Genesis Freedom/RSP/RWS”, Suiza, pp. 1 – 28.
69. VAILLANT F., MILLAN P. y REYNES M., 1998, “Fruits: Caracterisation préliminaire des polysaccharides pariétaux de la pulpe de corossol et étude de leur dégradation enzymatique”, Edicion, Editorial, Paris, Francia, pp.257-270.
70. VALERI, D., 2006, “La magia de las enzimas”, Énfasis Alimentación, 18(72)78
71. VIGNALE, B. y MEZZERA, R., 2009, “Los frutos del bosque nativo son una nueva opción productiva”, http://www.elicriso.it/es/naturaleza_sur_america/guayabo_%20pitanga/, (Julio 2009).

72. VILLACHICA, H., CARVALHO, J., MÜLLER, C., DIAZ, C. y ALMANZA, M., 1996, "Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia", Lima, Peru, Tratado de Cooperación Amazonica - Secretaria Pro-tempore. p. 367.
73. VILLAREAL, L., CURIOR, R. y VAILLANT, F., 1999, "Efecto de la microfiltración tangencial sobre las características nutricionales y funcionales del jugo de maracuyá", Editorial Guimar, Quito, Ecuador, pp.19-33.
74. VORAGEN, A., SCHOLS, H. y PILNIK, W., 1985, "Enzymic lysis of pectic substances in cell walls: some implications for fruit juice technology". ACS Symposium series: Chemistry and Fuction of Pectins, pp. 230-247.
75. WARD, O., 1984, "Hydrolytic Industrial Chemicals",. Biochemical National Institute for Higher Education, Dublin, Ireland, pp. 819-833.
76. YRWIN, H., 1997, "Cálculos de Bioquímica. Como resolver problemas matemáticos de bioquímica en general." 2da Edición, Editorial Acribia, México D.F., México, p. 275.
77. ZEMAN, L. y ZYDNEY, A., 1996, "Microfiltration and Ultrafiltration principles and applications", Editorial Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos, pp. 3-6, 13.

ANEXO A

MANUAL DE OPERACIÓN DEL EQUIPO PILOTO DE MICRO Y ULTRA FILTRACIÓN DE 0,24 m²

a) Características generales:

- Material de construcción: acero inoxidable AISI 304 L y partes en tubo flexible de alta presión.
- Módulo de filtración: adaptado para membranas cerámicas de micro y ultrafiltración de marca Membralox® Modelo P-19-40.
- Superficie de filtración instalada: 0,24 m².
- Flujo de perneado máximo con agua : 150 l.h⁻¹.
- Viscosidad máxima de los fluidos a tratar: 1.500 cP.
- Presión transmembranaria máxima: 10 bar.
- Rango de temperatura : 10° C a 110° C.

b) Operación:

El objetivo es establecer la forma en la que se deben llevar a cabo las pruebas de microfiltración tangencial empleando el módulo, que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Posiciones

VÁLVULAS	POSICIÓN A	POSICIÓN B	POSICIÓN C
VA01	Cerrada	Cerrada	Abierta
VA02	Cerrada	Cerrada	Abierta
VA03	Cerrada	Abierta	Cerrada

c) Procedimiento de filtración tangencial

- Acoplar el piloto a un tanque de alimentación limpio según los estándares para la industria de alimentos.
- Cerciorarse que el equipo esta en posición A (ver la tabla 1) y que el medidor de flujo este en su posición en la salida del permeado.
- Abrir VA01 y colocar la manguera 1 en el tanque de alimentación.
- Llenar el tanque de alimentación con la solución a filtrar.
- Poner la manguera de succión en el tanque de alimentación y llenar el circuito poniendo la bomba de alimentación (BE) en posición "ON" y a una velocidad promedio. Cerciorarse de la ausencia de burbujas de aire en el circuito alzando la manguera flexible M 01 bien arriba del circuito.

- Poner la bomba (BE) a velocidad 0. Cerrar la llave VA01. Prender la bomba BC.
- Poner el equipo en posición B, abriendo la válvula VA03 para dejar salir el perneado. El momento de la apertura de VA03 debe ser registrado por el computador como el tiempo 0 del ensayo.
- Aumentar paulatinamente la velocidad de BE de 0,2 bar cada 30 segundos hasta alcanzar la presión transmembranaria deseada para el ensayo.
- Mediante ajustes en el flujo de agua en el intercambiador de calor, ajustar manualmente la temperatura del perneado al valor deseado.
- Medir el volumen del perneado cada 5 minutos y proseguir el ensayo en esta posición hasta alcanzar el FRV de consigna.
- Una vez alcanzado el FRV de consigna, abrir la válvula micrométrica VM para extraer retenido y mantener el FRV de consigna según formula.
- Cuando haya terminado el proceso de filtración, apagar todas las bombas y drenar totalmente el circuito abriendo la válvula VA01, VA02 y VA03 y proceder inmediatamente con el lavado del equipo.

e) Limpieza y sanitización

- Inmediatamente después de cada ensayo, se debe realizar un ciclo de lavado. Si por una razón de fuerza mayor, el ciclo de lavado no puede realizarse inmediatamente después del ensayo, mantener el circuito lleno con agua limpia, hasta que el ciclo de lavado pueda realizarse.
- Poner la válvula VA03 en la posición alta del modulo y cerrarla.
- Una vez terminado el ensayo y drenado el producto del circuito abriendo la válvula VA01, VA02 y VA03, llenar el circuito con las soluciones cerrando las válvulas VA02 y VA03 y dejando abierta la válvula VA01.
- Una vez el circuito lleno, apagar la bomba BE y prender la bomba BC. Cerciorarse que exista una pequeña presión dentro del circuito. Si los manómetros marcan 0, prender la bomba BE hasta que la presión de salida al menos marque 0,2 bar. Apagar la bomba BE cuando la presión en el circuito es adecuada.
- Dejar recircular el tiempo definido a presión baja.
- Una vez terminada la recirculación a presión baja, abrir la válvula de salida del perneado VA03 y aumentar la velocidad de la bomba de alimentación (BE) hasta alcanzar una presión de salida de aproximadamente 2 bar.
- Cuando el tiempo haya terminado, drenar el equipo y pasar la siguiente solución según la tabla 2.

Tabla 2. Soluciones de limpieza

Sustancia	Tiempo	Temperatura	Procedimiento	Observaciones
Agua	10 min	>50° C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Agua	20 min	>50° C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	
Disolución NaOH al 2 %	20 min	>50° C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Disolución NaOH al 2 %	20 min	>50° C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	
Agua	10 min	>50° C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0 bar)	
Agua	20 min	>50° C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	Verificar que el pH del agua a la salida presente un pH adecuado
HACER PRUEBA DE PERMEABILIDAD CON AGUA DESIONIZADA SI (PARAR LAVADO), NO (PROSEGUIR)				
Disolución HNO ₃ al 1 %	20 min	>50° C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Disolución HNO ₃ al 1 %	20 min	>50° C	Equipo en posición de filtración (U = 5 m/s, Pe = 2 bar)	
Agua desionizada	10 min	>50° C	Equipo en posición de recirculación de retenido (Pe = 0,2 bar)	
Agua desionizada	20 min	>50° C	Equipo en posición de filtración (Pe = 2 bar)	Verificar que el agua a la salida sea pH 7. Hacer la prueba de permeabilidad
HACER PRUEBA DE PERMEABILIDAD CON AGUA DESIONIZADA SI (PARAR LAVADO), NO (PROSEGUIR)				
Retirar el modulo de la membrana y cerciorarse que ningún canal este tapado. En caso positivo, soplar con aire comprimido los canales y proseguir un nuevo ciclo de lavado.				

NOTAS:

- El agua a utilizar en las pruebas de permeabilidad y el procedimiento de lavado del microfiltrador tangencial debe ser suavizada. No se debe utilizar otro tipo de agua.
- Por la naturaleza del equipo, no permitir que el mismo funcione en ausencia de materia prima o agua.
- La membrana debe mantenerse siempre húmeda, incluso cuando el equipo ha sido apagado. Si el equipo va estar más de una semana sin uso, drenar el equipo y cerrar todas las llaves.

f) Procedimiento de la prueba de permeabilidad de la membrana al agua

- Utilizando agua, realizar al menos cuatro determinaciones del flujo a diferentes presiones de salida (Ps) entre 0,5 y 3 bar. Para ello, mover el botón de control de velocidad de la bomba BE.
- Cuando la presión es estabilizada, medir con una probeta el volumen de agua (V) que se obtiene durante 30 segundos (t). Anotar la temperatura en el circuito (T) y la presión de entrada (PE). Entre cada determinación, permitir que la presión de entrada se estabilice (alrededor de 3 minutos).
- Calcular la permeabilidad de la siguiente manera para cada presión:

$$\text{Permeabilidad} = \frac{R}{A \cdot P_{tm}}$$

Donde: R (L/h) = Flujo de Agua = V / t
 PTM (bar) = Presión Transmembranaria = $(P_e + P_s) / 2$
 A (m²) = Área de la Membrana = 0,22 m²

- Graficar el Flujo de Permeado (l.h⁻¹.m⁻²) contra la Presión Transmembranaria. Realizar la recta de mejor ajuste: Flujo = m.PTM. La pendiente (m) corresponde al valor de permeabilidad. El r² debe ser superior a 0,90 presente en la tabla y figura.
- Si el valor de permeabilidad obtenido es inferior al menos 90 % del valor de permeabilidad máxima (232 l.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹) se debe ejecutar de nuevo el procedimiento de limpieza.

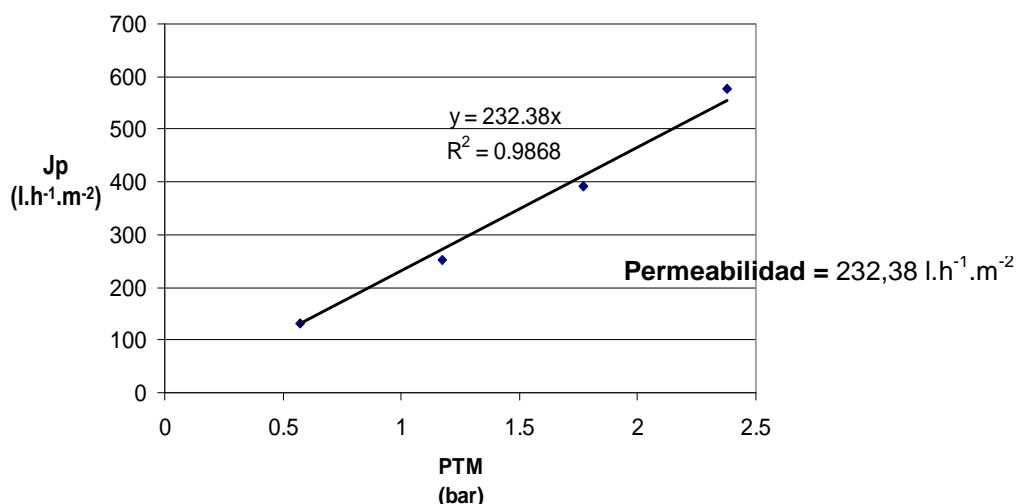


Figura 1. Relación entre la PTM y el Jp en la prueba de permeabilidad del equipo piloto con membrana de cerámica de 0.5 µm

Tabla 3. Prueba de permeabilidad del equipo piloto con membrana de cerámica de 0,5 μm

PE (bar)	PS (bar)	Flujo (ml/30 s)	P_{tm} (bar)	J_p (l.h⁻¹.m⁻²)
0,58	0,56	240	0,57	130,91
1,07	1,28	460	1,18	250,91
1,56	1,98	720	1,77	392,73
2,06	2,70	1060	2,38	578,18

ANEXO B

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO

DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO

a) Principio

Se basa en la completa degradación del almidón en glucosa por acción de enzimas (amilasa y amiloglucosidasa) y la determinación colorimétrica a 560 nm de la glucosa liberada utilizando el reactivo glucosa oxidasa-peroxidasa -(ácido 2-2' azinobis (3 etil bencetiazoline 6 sulfónico)).

b) Equipo y material

- Espectofotómetro UV-VIS, Shimadzu
- Balanza analítica de 500 g, Boeco
- Incubador - agitador P. Scientific
- pH – metro, Hanna
- Placa agitadora, Variomag telesistem
- Agitador, Vortex
- Erlenmeyers, Kimax
- Balones aforados, Kimax
- Embudos, Kimax
- Pipetas graduadas, Kimax
- Pipetas volumétricas, Kimax
- Tubos de ensayo, Pyrex
- Gradillas y porta embudos
- Papel filtro cuantitativo, Macherel

c) Reactivos

Alfa amilasa líquida (termamyl): Novo Nordisk 120 L KNU/G (*Merck 420*)

Solución tampón acetato 2 M pH 4,8: Pesar 16,4 g de acetato de sodio $C_2H_3O_2Na$ anhidro (*Merck 6268*) y disolver en 80 ml de agua destilada, adicionar 20 ml de ácido acético glacial (*Merck 90062*) y ajustar el pH a 4,8.

Solución tampón trifosfato: Pesar 7,32 g de trishidroximetil aminometano (trizma) (*Merck 8387*), 8,84 g de fosfato de sodio anhidro, disolver en 180 ml de agua y ajustar el pH a 7 con ácido ortofosfórico (*Merck 563*). Aforar a 200 ml con agua destilada.

Solución de amiloglucosidasa al 0,2 %: Pesar 100 mg de amiloglucosidasa (*Sigma A-7420*), disolver y aforar a 50 ml con agua destilada.

Solución de glucosa oxidasa - peroxidasa-ABTS: Pesar 100 mg de glucosa oxidasa (*Sigma G-6125, tipo II aspergillus niger 50000 U*), 3 mg de peroxidasa (*Sigma P-8125, tipo I 5000 U*) y 50 mg de ABTS (*Sigma A-1888, ácido 2-2' azino-bis (3 etil bencetiazoline-6-sulfónico)*), disolver y aforar a 100 ml con tampón trifostato.

Solución estándar de glucosa 1,2 mg/ml: Secar la glucosa a 60° C durante 4 horas. Pesar 120 mg de glucosa anhidra (*Fluka 49140*) y disolver y aforar a 100 ml con agua destilada previamente hervida. La solución se conserva en refrigeración.

d) Procedimiento

- Pesar 0,25 g de pared celular en un erlenmeyer con tapa, adicionar 50 ml de agua destilada, y agitar suavemente.
- Agregar 0,1 ml de alfa amilasa, colocar en un incubador - agitador a 90° C durante 1 hora.
- Sacar y dejar, filtrar a través de papel filtro cuantitativo en balones aforados, enjuagar el erlenmeyer varias veces con agua destilada y aforar a 100 ml.
- Tomar 0,2 ml del filtrado y llevar a 10 ml con agua destilada, dilución 1/50.
- Tomar 0,75 ml de la dilución 1/50, y agregar 0,2 ml de solución tampón acetato pH 4,8 y 0,05 ml de solución de amilogucosidasa.
- Colocar en un incubador - agitador a 60° C durante 2 horas.
- Sacar los tubos y enfriar.
- Agregar 2 ml de agua destilada, 2 ml de la solución glucosa oxidasa-peroxidasa - ABTS, agitar y dejar en reposo bajo oscuridad durante 30 min para que la reacción ocurra.
- Medir la absorbancia a 560 nm frente a un blanco colocado en la celda de referencia.
- **Blanco:** tomar 3 ml de agua destilada y 2 ml de solución glucosa oxidasa-peroxidasa-ABTS y dejar 30 minutos en un lugar oscuro.

d) Cálculos

$$\text{Almidón(\%)} = \frac{\text{LR}(\mu\text{g} / \text{ml}) * \text{Vt}(\text{ml}) * \text{FD} * 0.9 * (1\text{g} / 10^6 \mu\text{g})}{\text{Pm}(\text{g}) * (0.75)} * 100\%$$

Donde:

- LR = Lectura de regresión
- Vt = Volumen total
- FD = Factor de dilución (dividido para alícuota 0,75)
- Pm = Peso de la muestra
- 0,9 = Factor de conversión de % glucosa a % almidón

f) Referencias

HOLM, J.H. Bjorck, N.G. Asp. Starch 38. 1986. N° 7, S. 224-226. Método adaptado en los Laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP.

DETERMINACIÓN DE HEMICELULOSA Y CELULOSA

FIBRA DETERGENTE ACIDA

a) Principio

Para analizar los componentes de las paredes celulares se realiza una digestión con un detergente ácido (FDA) para hidrolizar la hemicelulosa. El residuo insoluble de este proceso contiene celulosa, lignina y se denomina fibra detergente ácida.

b) Equipo y material

- Equipo para digestión de fibras, Labconco
- Estufa, Termolyne
- Balanza analítica de 500g, Boeco
- Equipo de filtración
- Crisoles de vidrio, gosch
- Vasos de 600 ml de fibra
- Papel de micro fibra de vidrio GF/A 150 mm, Whatman
- Pipetas volumétricas, Kymax

c) Reactivos

Solución detergente ácida. Acido sulfúrico 1 N: Tomar 27.89 ml de ácido sulfúrico (*Fluka 84720, 95-97%, 1.83 g/ml*), y aforar a un litro con agua destilada.

Bromuro cetil trimetil amonio: Pesar 20 g de bromuro cetil trimetil amonio (*Merck 2342*), disolver y aforar a un litro con ácido sulfúrico 1N.

Alcohol isoamílico: (*Merck 978*)

d) Procedimiento

- Pesar 1 g de muestra
- Añadir 50 ml de solución detergente ácida, agitar suavemente.
- Acondicionar los vasos de fibra en el equipo de digestión, desde el momento que comience a hervir dejar 30 min.
- Adicionar 50 ml de solución detergente ácida, 1 ml de alcohol isoamílico, y colocar en el equipo de digestión durante 30 minutos más. Agitar periódicamente los vasos para mantener las partículas en suspensión.
- Filtrar la solución en crisoles de vidrio gosch previamente tarados, con agua desmineralizada caliente, lavar el residuo con agua caliente hasta eliminar completamente el detergente (aproximadamente con 500 ml de agua).
- Colocar los crisoles en una estufa a 105° C durante ocho horas (preferentemente una noche), sacar a un desecador, enfriar y pesar.

e) Cálculos

Según la ecuación:
$$FDA(\%) = \frac{P_2 - P_1}{P_3} * 100$$

Donde:

- P_1 = Peso del crisol
 P_2 = Peso del crisol con la muestra seca
 P_3 = Peso de la muestra

FIBRA DETERGENTE NEUTRA

a) Principio

Para determinar los componentes de la pared celular se realiza una digestión con un detergente neutro, donde la materia seca se divide y separa los constituyentes nutricionales solubles y accesibles de aquellos que no son totalmente aprovechables. El residuo insoluble de este proceso consiste de celulosa, hemicelulosa y lignina y se denomina fibra detergente neutra.

b) Equipo y material

- Balanza analítica
- Equipo para digestión de fibras, Labconco
- Estufa, Termolyne
- Equipo de filtración
- Vasos de 600 ml de fibra
- Crisoles de vidrio gosch
- Papel whatman de micro fibra de vidrio GF/A 150 mm
- Pipeta volumétricas

c) Reactivos

Solución detergente ácida (FDN): Pesar 30 g de lauril sulfato de sodio (*Merck 822050*); 18.60 g de etilen diamino tetracético (*Fluka 03610*); 6.81 g de borato de sodio decahidratado (*Merck 6308*); 4.56 g de disodio hidrógeno fosfato (*Fluka 71650*); adicionar 10 ml de 2 – etoxietanol (*Merck 9621*), disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Alfa amilasa líquida (termamyl): Novo Nordisk 120 L KNU/G (*Merck 420*)

Alcohol isoamílico: (*Merck 978*)

d) Procedimiento

- Pesar 1 g de muestra.
- Añadir 50 ml de solución detergente neutra y poner en el equipo de digestión durante 30 min desde el momento en que empiece a hervir.
- Añadir 50 ml de detergente neutro, 0.1 ml de α -amilasa y 1 ml de alcohol isoamílico, y colocar nuevamente en el equipo de digestión por 30 minutos, agitar periódicamente los vasos para mantener las partículas en suspensión.

- Filtrar la solución cuantitativamente a los crisoles de gosch previamente tarados, lavar el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 ml de agua desmineralizada), hasta eliminar todo residuo de detergente.
- Colocar los crisoles en una estufa a 105° C durante ocho horas (preferentemente una noche), sacar y colocar en un desecador, enfriar y pesar.

e) Cálculos

$$FDN(\%) = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} * 100$$

Donde:

- P₁ = Peso del crisol (g)
 P₂ = Peso del crisol con la muestra seca (g)
 P₃ = Peso de la muestra (g)

Para determinar el contenido de hemicelulosa y celulosa de la pared celular se realiza a partir de los resultados obtenidos de FDN y FDA y se calcula de la siguiente manera:

$$Hemicelulosa(\%) = \%FDN - \%FDA$$

f) Referencias

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist), 1998, "Peer Verified Methods. Manual on policies and procedures", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Arlington, Estados Unidos, s.p.

DETERMINACIÓN DE LIGNINA

a) Principio

Se realiza por el método de Klason (1931), modificada por Effland (1977). La lignina es cuantificada como la fracción resistente a una hidrólisis ácida en caliente. Este método no es específico de la lignina, las cenizas y las proteínas son igualmente cuantificadas.

b) Equipo y materiales

- Balanza analítica UWE de 2 kg, Geniweigher
- Estufa y Mufla, Termolyne
- Erlenmeyers con tapa, Kimax
- Probeta y pipetas, Kimax
- Crisoles de vidrio, gosch G4
- Papel de micro fibra de vidrio GF/A 150 mm, Whatman
- Desecador

c) Reactivo

Acido sulfúrico 72 %: Tomar 74,15 ml de ácido sulfúrico concentrado 97,1 % (*J.T. Baker*) y aforar a 100 ml con agua purificada.

c) Procedimiento

- Pesar 200 mg pared celular, adicionar 2 ml de ácido sulfúrico al 72 %, incubar durante 60 min a 30° C, homogenizar el medio frecuentemente.
- Adicionar 56 ml de agua destilada y agitar suavemente.
- Colocar en el auto clave durante 60 min a 120° C.
- Filtrar en caliente sobre crisoles de vidrio G₄, previamente tarados con papel whatman de fibra de vidrio.
- Lavar el residuo con abundante agua caliente con el fin de eliminar totalmente el ácido.
- Colocar los crisoles en una estufa a 105° C durante 8 horas (preferible una noche), sacar a un desecador y pesar.
- Colocar en una mufla a 540° C durante 4 horas, sacar a un desecador y pesar.
- Realizar un blanco utilizando solo ácido sulfúrico al 72 % y continuar como señala la metodología.

d) Cálculos

$$Lignina(\%) = \frac{(P_2 - P_3)}{P_1} * 100\%$$

Donde:

P₁ = Peso de la muestra (g)

P₂ = Peso del crisol más muestra seca (g)

P₃ = Peso del crisol más cenizas (g)

e) Referencias

Método de Klason (1931), modificada por Effland (1977). Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP.

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**a) Principio**

La humedad de la muestra se pierde por volatilización a causa del calor. El material residual después de eliminar la humedad, constituye la materia seca.

b) Equipo y material

- Estufa, Termolyne
- Balanza analítica de 2 kg, UWE Geniweigher
- Latas de Aluminio

- Pinza metálica
- Desecador

c) Procedimiento

- Pesar aproximadamente 10 g de muestra fresca (ó 1 g de muestra seca), y colocar en latas de aluminio previamente taradas.
- Colocar en una estufa a 105° C durante 8 horas (o por una noche).
- Enfriar en un desecador y pesar la muestra seca.

d) Cálculos

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{(P_2 - P_1) - (P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)} \right) * 100$$

Donde:

- P₁ = Peso de la lata vacía (g)
 P₂ = Peso de la lata con la muestra fresca (g)
 P₃ = Peso de la lata con la muestra seca (g)

e) Referencias

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist), 1998, "Peer Verifed Methods. Manual on policies and procedures", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Arlington, Estados Unidos, s.p.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS

a) Principio

La muestra es incinerada en una mufla a 600° C, previa precalcincación en una placa calentadora o reverbero, para eliminar todo el material orgánico. El material inorgánico que no se destruye se denomina ceniza.

b) Equipo y material

- Balanza analítica de 2 kg, UWE Geniweigher
- Mufla y Placa calentadora, Termolyne
- Pinza metálica
- Crisoles de porcelana
- Desecador

c) Procedimiento

- Pesar de 1,5 a 2,0 g de muestra y colocar en crisoles previamente tarados.
- Precalcinar la muestra hasta que no se desprenda humo.
- Colocar en una mufla a 600° C durante 8 horas (o por una noche).
- Sacar los crisoles, enfriar en un desecador y pesar.

d) Cálculos

$$Cenizas(\%) = \left(\frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \right) * 100$$

Donde:

- P_1 = Peso del crisol vacío (g)
 P_2 = Peso del crisol más muestra (g)
 P_3 = Peso del crisol más cenizas (g)

e) Referencias

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist), 1998, "Peer Verified Methods. Manual on policies and procedures", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Arlington, Estados Unidos, s.p.

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GALACTURÓNICO EN LA PECTINA SOLUBLE EN AGUA

a) Principio

El polisacárido de la pectina se hidroliza en medio ácido liberando monómeros de ácidos urónicos, los monómeros ácidos liberados son deshidratados en derivados furforilos que forman con el meta hidroxidifenil (MHDP) un complejo color rosado que presenta un máximo de absorción a 520 nm.

b) Equipo y material

- UV-VIS, Shimadzu
- Baño maría, Salvis
- Balanza analítica de 2 kg, UWE Geniweigher
- Agitador, Vortex
- Incubador-agitador P. Scientific
- Tubos de ensayo con tapa, Kimax
- Pipetas eppendorf, Kimax
- Pipetas graduadas, Kimax
- Gradillas
- Papel filtro, Whatman GFA

c) Reactivos

Acido sulfúrico 72 %: Tomar 74.15 ml de ácido sulfúrico concentrado 97,1% (*J.T. Baker*) y aforar a 100 ml con agua purificada.

Acido sulfúrico concentrado: Concentración 95-97 % (*Merck*)

Hidróxido de sodio NaOH 0.5 %: Pesar 0,5 g de hidróxido de sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Meta hidroxifenil MHDP: Pesar 37,5 mg de MHDP (*Sigma L-62250*), disolver y aforar a 25 ml con hidróxido de sodio al 0,5%.

Tetraborato de Sodio 0.0125 M: Pesar 477 mg de tetraborato de sodio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (*Fluka 7200*), disolver en 100 ml con ácido sulfúrico concentrado.

d) Procedimiento

Preparación de la muestra: Hidrólisis Saeman

- Pesar 5 mg de muestra en tubos de ensayo con tapa.
- Adicionar 0,15 ml de ácido sulfúrico al 72 %, incubar por 3 horas a 25° C, homogeniza regularmente el medio.
- Añadir 1,55 ml de agua destilada, incubar durante 2 horas a 100°C.
- Enfriar y filtrar en papel filtro de microfibras de vidrio whatman GFA.

Cuantificación

- Medir 2,4 ml de solución de bórax en un tubo de ensayo, colocar en un baño de hielo durante 10 min.
- Añadir lentamente 0,4 ml de muestra o de la dilución, agitar en vortex.
- Colocar los tubos en agua a ebullición durante 10 min.
- Enfriar en baño de agua con hielo.
- Añadir 40 μl de MHDP y agitar.
- Medir la absorbancia a 520 nm, exactamente a los 10 minutos de haber añadido el reactivo meta hidroxidifenil
- Preparar un blanco para cada muestra y estándar de la misma manera, reemplazando el meta hidroxidifenil por 40 μl de hidróxido de sodio al 0,5 %.

e) Cálculos

$$\mu\text{gAGU} = LR(\mu\text{g} / \text{ml}) * FD * V_t(\text{ml})$$

$$\% \text{AGU} = \frac{\mu\text{gAGU}}{\text{Peso}(\text{mg})} * 10^{-3}(\text{mg} / \mu\text{g}) * 0.907 * 100$$

Donde:

- LR = Lectura de Regresión
 FD = Factor de dilución (400/10)
 Vt = Volumen final
 0,907 = Factor de corrección de AGU hidratado a AGU anhidro

Determinación del grado de esterificación:

Para calcular el grado de esterificación de la pectina es necesario conocer los micromol de metanol y ácido galacturónico, y se procede de la siguiente manera:

$$G.E = \frac{X}{Y} * 100$$

Donde:

- GE = Grado de esterificación.
 X = Concentración de metanol (μmol metanol/mg pectina).
 Y = Concentración de ácido galacturónico (μmol AGU/mg pectina)

e) Referencias

BLUMENKRANTA, HANSEN, A., 1973, AHMED, LABEVITH, 1977, "Método del Metahidroxifenil", Adaptado en los Laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, s.p.

DETERMINACIÓN DE ESTERES METÍLICOS

a) Principio

El metanol, liberado por la hidrólisis alcalina de las muestras, es oxidado a formaldehído utilizando la enzima alcohol oxidasa a pH 7,5 (pH óptimo de la enzima). El formaldehído reacciona con el amoníaco y la 2,4 - pentanodiona para formar un complejo de color amarillo con un máximo de absorción a 412 nm.

b) Equipo y material

- Espectrofotómetro UV-VIS, Shimadzu
- Baño maría, Salvis
- Placa agitadora, Variomag telesistem
- Agitador, Vortex
- Incubador-agitador P. Scientific
- Tubos de ensayo con tapa, Kimax
- Pipetas eppendorf, Kimax
- Pipetas graduadas; Kimax
- Gradilla

c) Reactivos

Hidróxido de potasio KOH 2,5 N: Pesar 7,0138 g, disolver y aforar a 50 ml con agua destilada.

Ácido orto fosfórico 85 %: (Merck 563)

Solución tampón fosfato 0,25 M, pH 7,5: Mezclar 16 ml de solución A con 84 ml de solución B y aforar a 200 ml con agua destilada.

Solución A: Pesar 2,7598 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346,) disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución B: Pesar 7,17 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka 71650), disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 8: Mezclar 5,3 ml de solución C y 94,7 ml de solución D y llevar a 200 ml.

Solución C: Pesar 3,4023 g de fosfato ácido monobásico de potasio KH_2PO_4 , disolver y aforar a 500 ml con agua destilada.

Solución D: Pesar 11,4115 g de fosfato ácido di básico de potasio $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck 5099, disolver y aforar a 500 ml con agua destilada).

Acido acético 0.05 M: Tomar 289 μl de ácido acético glacial (Merck 90062, 1,06 g/ml, 96%) y llevar a 100 ml con agua destilada.

Solución tampón de acetato de amonio 2M: Mezclar 15,42 g de acetato de amonio (Merck 1116) y disolver en 100 ml de ácido acético 0,05M.

2,4 - pentanodiona (acetil acetona) $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ 20 mM: Tomar 206 μl de 2,4-pentanodiona (Sigma A3511, densidad 0,97g/ml) y llevar a 100ml con acetato de amonio 2M.

$$\frac{0.02\text{mol}(20\text{mM})}{1000\text{ml}} * \frac{100.1\text{g}}{1\text{mol}} * 100\text{ml} * \frac{\text{ml}}{0.97\text{g}} = 0.206\text{ml}(206\mu\text{l})$$

Enzima alcohol oxidasa diluida: La alcohol oxidasa (nkat/ml, presentación de 0,2 ml, 45 mg de proteína/ml ó 30 unidades/mg proteína (Biuret). Sigma A-2404).

Nota: Una unidad oxida 1 μmol metanol a formaldehído por minuto a pH 7,5 a 25° C., esta enzima debe almacenarse a menos 20° C.

d) Procedimiento

- Pesar 1 mg de pectina y disolver en 1,6 ml de agua.
- Añadir 400 μl de hidróxido de potasio 2,5 N y agitar durante 30 minutos a una temperatura ambiente (25° C).
- Ajustar el pH a 7,5 utilizando ácido orto fosfórico diluido (1:3) y llevar a 10 ml con tampón fosfato 0,25 M (pH 7.5).
- Tomar 1 ml de muestra o 1 ml de cada estándar y adicionar 1 ml de enzima diluida (16,67 nKatal/ml), colocar 15 min a 25° C, añadir 2 ml de reactivo de 2,4 - pentanodiona preparada con anterioridad y agitar.
- Incubar la solución a 60° C durante 15 minutos, enfriar y medir la absorbancia a 412 nm. frente a un blanco que puede ser buffer fosfato o agua.

e) Cálculos

$$\% \text{Me tan ol} = \frac{LR(\mu\text{l})}{l} * \frac{1\text{l}}{1000\text{ml}} * \frac{1\text{ml}}{1000\mu\text{l}} * \frac{0.79\text{g}}{1\text{ml}} * \frac{10\text{ml}}{\text{Pesopectin a}(\text{mg})} * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} * 100$$

f) Referencias

OLLE D, 1997, "Caractérisation des Polysaccharides et des composés Aromatiques de différents cultivars de Mangue (*Mangifera indica* L). Devenir de ces Constituants lors de la Préparation de Concentrés Aromatiques Pulpeux", Université de Paris, Paris, Francia, p.167.

KLAVONS, J., BENETT, R., 1986, "Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins", J. Agric. Food Chem, 34: 597-599

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN SUSPENSIÓN

a) Principio

Es un método que utiliza la propiedad de sedimentación de partículas con base a su masa, para la separación de las mismas en una solución. Para este análisis se utiliza la fuerza centrífuga constante para impeler la materia hacia fuera del centro de rotación y así separa las partículas insolubles del medio líquido por sedimentación.

b) Equipo y material

- Balanza de 2 kg, UWE Geniweigher
- Ultracentrífuga, Internat. Equipment
- Cronómetro, Thomas Scientific
- Tubos graduados, Falcon
- Gradillas

c) Procedimiento

- Pesar la pulpa enzimada en los tubos de centrifuga previamente pesados.
- Centrifugar a 3.500 rpm durante 15 minutos.
- Pasar el sobrenadante a un vaso o tubo.
- Escurrir todo el líquido sobre papel toalla teniendo cuidado de no perder muestra y pesar el tubo con el residuo.

d) Cálculos

Los sólidos insolubles en suspensión se calcula de la siguiente manera:

$$SIS(\%) = \frac{Pr - Pt}{Pm} * 100\%$$

Donde:

SIS	=	Sólidos insolubles en suspensión
Pr	=	Peso del tubo más residuo
Pt	=	Peso tubo vacío
Pm	=	Peso de la pulpa

e) Referencias

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist), 1998, "Peer Verifed Methods. Manual on policies and procedures", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Arlington, Estados Unidos, s.p.

DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD CINEMÁTICA

Principio

La viscosidad de los fluidos disminuye con el incremento con la temperatura, y por ello estos pueden fluir con mayor rapidez a través de un conducto.

Equipo y material

- Viscosímetro de vidrio Cannon Frenske tamaño 200, utilizado para las muestras de: sobrenadante de centrifugación y jugo clarificado de arazá.
- Cronómetro, Thomas Scientific
- Termómetro, Traceable Control
- Pipetas eppendorf, Kimax
- Gradillas

Procedimiento

- Transvasar 5 ml de muestra por el capilar del viscosímetro de vidrio Cannon-Frenske.
- Absorber el líquido suavemente con una pera por el capilar hasta la parte superior.
- Medir el tiempo que demora en pasar el líquido desde el engrase superior al engrase inferior del capilar del viscosímetro.
- Realizar el mismo procedimiento con agua destilada para determinar la constante K del viscosímetro.

Cálculos

La viscosidad cinemática se calcula de la siguiente manera:

$$\mu = K.t$$

$$K = \frac{k_{agua}}{t_{agua}}$$

Donde:

- μ = Viscosidad cinemática (cSt)
- K = Constante del viscosímetro (cSt / s)
- K_{agua} = 0,884 cst, viscosidad del agua a 25° C * (cSt)
- t = Tiempo recorrido de la muestra (s)
- t_{agua} = Tiempo recorrido del agua (s)

Referencias

- SINGH y HELDMAN, 2001, Introduction to Food Engineering, Third edition, p.p.144-161.
- ALVARADO, J., 1996, "Principios de ingeniería aplicados a alimentos", Ambato, Ecuador, p.p. 185, 182, 201-207.
- GREEN, D., PERRY, R., 2008, "Perry's chemical engineers' handbook", 8va Edición, Mc-Graw Hill, New York, Estados Unidos, s.p.

DETERMINACIÓN DE VISCOSIDAD DINÁMICA

a) Principio

Los fluidos tienen diferentes características reológicas que se pueden describir por la medida de la viscosidad, por lo al medir la viscosidad en un viscosímetro rotacional Brookfield Modelo RVDV-II+, nos va a permitir determinar los parámetros reológicos como son: índice de consistencia K ($\text{Pa}\cdot\text{s}^\eta$) y el índice de comportamiento al flujo η (adimensional) para poder determinar el tipo de comportamiento y tipo de flujo que presentan las pulpas.

b) Equipo y material

- Viscosímetro rotacional, Brookfield

c) Procedimiento

- Colocar la muestra en la cámara acoplada al adaptador para muestras pequeñas, acondicionado a 25°C .
- Colocar el spindle de acuerdo al tipo de muestra (S 14)
- Leer la viscosidad (cP), en un rango de 0 a 200 rpm

d) Cálculos

Para determinar los parámetros reológicos: η índice de comportamiento al flujo y K índice de consistencia, se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\tau = k \cdot (\dot{\gamma})^\eta$$

Donde:

- $\dot{\gamma}$ = Esfuerzo de cizalla o esfuerzo cortante (Pa)
- K = índice de consistencia
- η = índice de comportamiento al flujo
- τ = Velocidad de deformación en cizalla o velocidad de cizalla (s^{-1})

e) Referencias

ALVARADO, J., 1996, "Principios de ingeniería aplicados a alimentos", Ambato, Ecuador, p.p. 185, 182, 201-207.

SINGH y HELDMAN, 2001, Introduction to Food Engineering, Third edition, p.p.144-161.

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES

a) Principio

La concentración de sólidos solubles se mide por refractometría. La desviación

del ángulo luminoso está relacionado con el contenido de elementos solubles presentes dentro de una muestra (azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes).

b) Equipo y material

- Refractómetro, Atago
- Vasos de precipitación, Kimax
- Varilla de agitación
- Papel Kleenex
- Piceta

c) Procedimiento

- Levantar la cubierta del refractómetro y colocar dos o tres gotas de jugo de fruta sobre el prisma de la superficie.
- Cerrar la cubierta del refractómetro y presionar ligeramente para evitar la presencia de burbujas teniendo en cuenta que se cubra toda la superficie.
- Leer la concentración de sólidos solubles en grados Brix
- Levantar la cubierta, lavar con agua destilada y secar suavemente con papel kleenex.

d) Cálculos

La concentración de sólidos solubles de la fruta analizada se expresa directamente el valor de la lectura expresada en grados Brix.

e) Referencias

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist), 1998, "Peer Verified Methods. Manual on policies and procedures", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Arlington, Estados Unidos, s.p.

DETERMINACIÓN DEL COLOR

a) Principio

El color se determina por el Sistema Hunter, se utiliza el equipo marca ColorTec-PCM™. El color se reportará en L* (luminosidad), a* (rojo+, verde-) y b* (amarillo+, azul-). La escala de parámetros L, a y b se usará para calcular en ángulo Hue (H), la cromaticidad (C) y el índice de oscurecimiento (IO).

b) Equipo y material

- Colorímetro, Tec-PCM/PSM
- Cajas petri, Kimax

c) Procedimiento

- Colocar la muestra en una caja petri pequeña, tapar teniendo cuidado de no dejar grumos o burbujas en la caja.
- Colocar el prisma del ColorTec-PCM/PSM sobre la superficie de la caja, tratando de cubrir toda la superficie.
- Tomar las lecturas en diferentes zonas de la caja. Anotar : L, a, b,

d) Cálculos

$$H = \arctg(b/a)$$

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$IO = 100 * ((a + 1,75 * L) / (5,645 * L + a - 3,012 * b) - 0,31) / 0,172$$

e) Referencias

Manual ColorTec PCM/PSMTM, adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP

Alvarado, J; Aguilera, J. 2001. Métodos para medir propiedades físicas e industriales de alimentos. España. Editorial Acribia, S. A. pp. 157, 329.

DETERMINACIÓN DE LA TURBIDEZ


a) Principio

El método más empleado para determinar la turbidez de una solución, es la nefelometría. Se basa en que al incidir en una muestra un rayo luminoso, las partículas en suspensión dispersan parte de la luz que penetra en la muestra. Esa luz dispersada se recoge sobre una célula fotoeléctrica provocando una corriente eléctrica en función de su intensidad, y por lo tanto, del grado de turbidez de la muestra.

b) Equipo y material

- Fotómetro, Macherey – nagel

c) Procedimiento

- Pulsando la tecla **M** buscar el método VISOCOLOR
- Con la tecla  establecer el modo 921 Turbidez 10 – 400 FAU
- Pulsar la tecla **Null Zero**.
- Ajustar la rueda de filtros a 6, colocar la cubeta de vidrio cilíndrica, limpia, con el valor blanco (la muestra sin tratar), en el fotómetro, pulsar la tecla **Null Zero**.

- Colocar en el fotómetro la cubeta cilíndrica de vidrio con la solución de muestra, pulsar la tecla **M** para realizar la lectura

d) Referencias

Manual Fotómetro MACHEREY – NAGEL, adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

a) Principio

Se determina por el método de la antrona. Se realiza una hidrólisis de los polisacáridos en medio ácido en caliente. La antrona reacciona con las hexosas y las aldopentosas para dar un complejo de color azul - verdoso, presentando un máximo de absorbancia a 625 nm.

b) Equipo y material

- Espectrofotómetro UV – VIS, Shimadzu
- Balanza analítica de 500 g, BOECO
- Placa agitadora, Variomag telesistem
- Baño maría, Salvis
- Agitador de tubos Mix II, Thermolyne
- Embudos, Kimax
- Porta embudos
- Erlemneyes, Kimax
- Balones aforados, Kimax
- Papel filtro cualitativo, Macherey-nagel
- Tubos de ensayo, Kimax
- Pipetas graduadas, Kimax
- Pipetas volumétricas, Kimax
- Micropipeta, Eppendorf
- Agitadores
- Gradillas

c) Reactivos

Acido sulfúrico concentrado H_2SO_4 : Concentración 95-97 %.

Solución de antrona: Pesar 200 mg de antrona y adicionar 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Solución estándar de glucosa 50 mg/l: Pesar 0,5 g de glucosa D-(+)-glucosa $C_6H_{12}O_6$, disolver y aforar a 100 ml con agua destilada. Tomar 1 ml y diluir a 100 ml.

d) Procedimiento

d1) Preparación de la muestra:

- Pesar aproximadamente 1 g de muestra liofilizada ó 30 g de muestra fresca.
- Extraer con 75 ml de agua destilada por una hora sobre una placa agitadora.
- Filtrar y aforar a 100 ml con agua destilada

d2) Cuantificación:

- Tomar 1,25 ml de muestra, previamente diluida y colocar en un baño de hielo.
- Adicionar 2,5 ml de reactivo de antrona, agitar los tubos y colocar en un baño de agua a ebullición durante 10 min.
- Sacar los tubos y colocar en un baño de hielo durante 10 minutos y agitar.
- Leer la absorbancia a 625 nm.

e) Cálculos

$$\% \text{ Azúcares } To \text{ tales } = \frac{LR * V * FD * 10^{-6} (g / \mu g)}{Pm} * 100$$

Donde:

- LR = Lectura de regresión ($\mu\text{g/ml}$)
 V = Volumen final (ml)
 FD = Factor de dilución
 Pm = Peso de la muestra (g)

f) Referencias

DUBOIS, M.; Hamilton J.; Repus P.; Smith F., 1956, "Coloreometric method for determination of sugar and related substances", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Anal, Chem, pp. 28-300-356.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

a) Principio

Los azúcares reductores se realiza según el método DNS. Se basa en la reducción del ácido 3,5 dinitrosalisílico a ácido 3-amino-5 nitrosalisílico por el grupo carbonilo libre de los azúcares reductores. El complejo formado es medido espectrofotométricamente a 540 nm. Siendo la densidad óptica proporcional a la concentración de azúcares reductores.

b) Equipo y material

- Espectrofotómetro UV – VIS, Shimadzu
- Balanza analítica de 500 g, BOECO
- Placa agitadora, Variomag telesistem
- Baño maría, Salvis
- Agitador de tubos Mix II, Thermolyne

- Embudos, Kimax
- Porta embudos
- Erlemneyes, Kimax
- Balones aforados, Kimax
- Papel filtro cualitativo, Macherey-nagel
- Tubos de ensayo, Kimax
- Pipetas graduadas, Kimax
- Pipetas volumétricas, Kimax
- Micropipeta, Eppendorf
- Agitadores
- Gradillas

c) Reactivos

Reactivo Dinitrosalicílico (DNS):

Solución A: Pesar 13,5 g de hidróxido de sodio NaOH PM 40 g/mol, pureza 99% y disolver en 300 ml de agua destilada.

Solución B: Pesar 8,8 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS, $C_7H_4N_2O_7$ y disolver en 400 ml de agua destilada, adicionar 225 g de tartrato de sodio y potasio $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ y ajustar con 400 ml de agua destilada.

Solución C: Mezclar las soluciones A y B, esta solución se conserva 1 año en refrigeración.

Solución D: Pesar 2,2 g de hidróxido de sodio NaOH (; 10 g de fenol cristalizado C_6H_5OH , PM 94,11 g/mol en 100 ml de agua destilada

Solución de bisulfito de sodio: Pesar 5 g de bisulfito de sodio y aforar a 25 ml de agua destilada.

Solución de trabajo: A la **solución C** agregar 69 ml de la **solución D** y 23.2 ml de bisulfito de sodio. Conservar en frasco oscuro en refrigeración. Esta solución dura máxima un año. Usar cinco días después de su preparación

Solución de hidróxido de sodio 1 M: Pesar 40,8163 g de NaOH PM 40 g/mol, disolver y aforar a 1000 ml de agua destilada.

Solución estándar de glucosa 2000 ppm: Pesar 50 mg de D-(+)-glucosa, $C_6H_{12}O_6$, disolver y aforar a 25 ml con agua destilada.

d) Procedimiento

- Tomar 0,5 ml de muestra o de la dilución en un tubo de ensayo
- Adicionar 0,5 ml de hidróxido de sodio 1M y 1,5 ml de DNS y agitar
- Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos, enfriar en baño de agua hielo, adicionar 9,5 ml de agua destilada y agitar
- Medir la absorbancia a 540 nm.

e) Cálculos % Azúcares Reductores =
$$\frac{LR * V_t * FD * 10^{-6} (g / \mu g)}{P_m} * 100$$

Donde:

LR	=	Lectura de regresión ($\mu\text{g/ml}$)
Vt	=	Volumen final (ml)
FD	=	Factor de dilución
Pm	=	Peso de la muestra (g)

f) Referencias

MILLER, G., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Anal, Chem, pp. 31:426-428.

DETERMINACIÓN DE ACIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)

a) Principio

El ácido ascórbico reduce el ácido molibdofosfórico amarillo a azul de fosfomolibdeno, cuya concentración se determina por reflectometría, que es una técnica basada en la interacción entre luz y materia, la luz es una forma de energía que se expresa en parámetros de onda, por la óptica geométrica se detectó la reflexión.

b) Equipo y material

- Reflectómetro, RQ flex 16970
- Licuadora, Oster
- Reflectoquant 1.16981, Test Ácido Ascórbico (tubo conteniendo 50 tirillas analíticas y una tira de código de barras), Merck, de 25 - 450mg/l
- Vasos de precipitación, balones aforados, Kimax

c) Procedimiento

- Pesar 30 g de muestra, licuar y llevar a un volumen conocido (200 ml) con agua destilada.
- Calibrar el equipo, con la curva de calibración que viene con las tirillas.
- Tomar una tirilla analítica del tubo y cerrar inmediatamente.
- Presionar la tecla STAR del reflectómetro e introducir de forma absolutamente simultánea la tirilla analítica con ambas zonas de reacción durante aproximadamente 2 segundos en la muestra. Eliminar el exceso de líquido de la tirilla, sacudiéndola manualmente.
- Cuando suene la señal acústica (5 segundos antes de transcurrir el tiempo de reacción) la tirilla ya deber estar introducida con la zona de reacción en dirección a la pantalla hasta el tope en el adaptador de tirillas
- Después de transcurrido el tiempo de reacción, leer en la pantalla el valor de medición en mg/l de ácido ascórbico. El valor se almacena automáticamente.
- Si el valor de medición es superior al intervalo de medida, debe repetirse la medición con nuevas muestras diluidas hasta obtener un valor inferior a 450

mg/l de ácido ascórbico, que luego se multiplicará por el correspondiente factor de dilución.

$$\mathbf{d) \text{ Cálculos}} \textit{ VitamninaC (mg /100 g.acidoascórbico)} = \frac{L * V}{Pm}$$

Donde:

- L = Lectura (mg/l)
 V = Volumen final (ml)
 Pm = Peso de la muestra (g)

e) Referencias

Método reflectométrico MERCK, Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad INIAP

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

a) Principio

Los polifenoles son comúnmente determinados usando el reactivo de Folin&Ciocalteu's que interactúa con otras sustancias reduciendo las sustancias no fenólicas llevando a una sobrestimación del contenido de polifenoles.

b) Equipo y material

- Espectrofotómetro UV VIS, Shimadzu
- Balanza analítica de 500 g, BOECO Placa agitadora
- Papel filtro cualitativo, Macherey-nagel
- Balones aforados, Kimax
- Pipetas volumétricas, Kimax
- Probetas, Kimax
- Viales con tapa, Kimax
- Vasos de precipitación; Kimax
- Cronómetro, Thomas Scientific
- Agitadores magnéticos
- Cartuchos, OASIS
- Termómetro, Traceable Control

c) Reactivos

Acetona 70:30 (v/v): Medir 70 ml de acetona CH_3COCH_3 grado p.a. PM 58,08 g/mol, $\geq 99,8\%$, $\delta=0,79$ g/ml y mezclar con 30 ml de agua destilada.

Metanol puro: grado p.a CH_3OH , PM 32,04 g/mol, pureza 99,90 %.

Solución de carbonato de sodio 75 g/l: Pesar 75 g de carbonato de sodio Na_2CO_3 , grado p.a, Na_2CO_3 , pureza $\geq 99,9\%$, PM 105,99 g/mol-g, disolver con un poco de agua destilada caliente y aforar a 1000 ml.

Reactivo de Folin-Ciocalteus: Tomar 1 ml del reactivo de Folin, adicionar 9 ml de agua destilada, dilución 1/10.

Solución estándar de ácido gálico de 500 ppm: Pesar 0,0564 g de ácido gálico monohidratado $(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 98 %, disolver y aforar a 100 ml con agua destilada. Prepara una curva de 0-500 ppm, tomar 50 μl de cada estándar, adicionar 450 μl , (volumen final 500 μl) y proceder con el método.

Solución estándar de ácido L(+)-ascórbico de 1000 ppm: Pesar 0,1003 g de ácido L(+)-ascórbico p.a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 99,7 % disolver y aforar a 100 ml con agua destilada. Prepara una curva de 0-1000 ppm, tomar 500 μl de cada estándar y proceder con el método.

d) Procedimiento

- Pesar entre 0,3 g a un 1 g de muestra liofilizada, en viales con tapa.
- Adicionar 10 ml de la mezcla acetona/agua.
- Agitar por 45 minutos en una placa agitadora.
- Centrifugar por 10 min a 3500 rpm. y/o filtrar a través de papel filtro.
- Recoger el filtrado en viales con tapa (*extracto bruto*).

Determinación de los componentes solubles totales en agua (Fracción A)

- Tomar 25 μl , 50 μl ó 75 μl del extracto bruto.
- Adicionar 475 μl , 450 μl ó 425 μl de metanol.
- Medir utilizando el método de Folin.

Separación de polifenoles y compuestos solubles en agua (Fracción B)

- Tomar 500 μl del extracto bruto.
- Adicionar 3,5 ml de agua.
- Colocar 2 ml de esta solución en un cartucho OASIS previamente acondicionado (3 ml de metanol + 2 x 3 ml de agua).
- Lavar con 2 x 2 ml de agua.
- Tomar 500 μl del extracto lavado.
- Medir utilizando el método de Folin.

NOTA: Después de cada análisis lavar los cartuchos OASIS con: 4 x 3 ml de metanol puro. Lavar con 2 x 2 ml de agua destilada.

Eliminación de Vitamina C del extracto lavado (Fracción C)

- Tomar 3 ml del extracto lavado en tubos de ensayo.
- Colocar en un baño de agua a 85° C por dos horas.
- Tomar 500 μl del extracto lavado.
- Medir utilizando el método de Folin.

Método de Folin

- Adicionar 2,5 ml de Folin-Ciocalteu (diluido en 1/10 con agua).
- Dejar a temperatura ambiente por dos minutos.
- Adicionar 2 ml de carbonato de sodio, agitar e incubar inmediatamente a 50° C por 15 minutos exactos. Enfriar los tubos rápidamente en agua a 4° C.
- Leer la absorbancia inmediatamente a 760 nm. Realizar las mediciones en duplicado.

e) Cálculos

Polifenoles Totales (mg ácido gálico/100 g muestra) = A – B

$$A \text{ (mg/100g)} = LR_a * \frac{Vt}{Pm}$$

$$B \text{ (mg/100g)} = \left[LR_b * \frac{Vt}{Pm} * FD \right] * \frac{1}{10}$$

Vitamina C (mg ácido ascórbico/100g muestra) = B-C

$$Vita \text{ min } aC \text{ (mg ácido ascórbico / 100g)} = \left[\frac{B-C}{pc} * \frac{Vt}{Pm} * FD \right] * \frac{1}{10}$$

Donde:

- LR_a = Concentración en mg/l de ácido gálico de la Fracción A
 LR_b = Concentración en mg/l de ácido gálico de la Fracción B
 Vt = Volumen total (ml)
 Pm = Peso muestra (g)
 FD = Factor de dilución Fracción B ((4/0,5)*(6/2))
 B = ABS a 760 nm de la Fracción B
 C = ABS a 760 nm de la Fracción C
 pc = Pendiente – curva de ácido ascórbico (mg/l)

f) Referencias

STEPHANE, G; PIERRE, B; PASCALINE, A; MARIE, J., 2005, “Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant – Derived Products”, Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Journal of Agricultural and Food, Chemis, Vol. 53, pp. 1370 -1373

DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES

a) Principio

Los carotenoides totales se determinan **espectrofotométricamente** a una longitud de onda de 450 nm, utilizando una curva de un estándar de caroteno (β-caroteno) a una longitud de onda de 450 nm.

b) Equipo y material

- Espectrofotometro UV – VIS Shimadzu
- Balanza analítica
- Centrífuga

- Baño ultrasonido
- Placa agitadora
- Agitadores magnéticos
- Vasos de precipitación y embudos de separación
- Tubos para centrifuga de 50 ml con tapa
- Pipetas y viales con tapa
- Micropipeta y puntas
- Cronómetro

c) Reactivos

Solución Etanol: Hexano: Mezclar etanol, grado p.a. C_2H_5OH , pureza $\geq 99,9\%$, PM 46,07 g/mol-g, con hexano, grado p.a. $CH_3(CH_2)_4CH_3$, pureza $\geq 96,0\%$, PM 86,18 g/mol-g en la proporción 4:3 (v/v).

Butilhidroxitolueno BHT 0,1%: Pesar 0,1 g de 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol BHT $C_{15}H_{24}O$, PM 220,36 y disolver en la mezcla etanol-hexano.

Hexano: grado HPLC, $CH_3(CH_2)_4CH_3$, pureza $\geq 98,0\%$, PM 86,18g/mol.

Acetonitrilo: grado HPLC, CH_3CN , pureza $\geq 99,9\%$, PM 41,05 g/mol-g.

Metanol: grado HPLC, CH_3OH , pureza $\geq 99,9\%$, PM 32,04 g/mol-g.

Cloroformo: grado HPLC, $CHCl_3$, pureza 99,9% PM 119,38 g/mol-g.

Sulfato de sodio: grado p.a., Na_2SO_4 pureza $\geq 99,0\%$, PM 14,04 g/mol-g.

Fase móvil para HPLC: Acetonitrilo : Metanol : Cloroformo (47:47:6). Mezclar 470 ml de acetonitrilo, 470 ml de metanol y 60 ml de cloroformo, colocar en el baño ultrasonido por cinco minutos.

Solución patrón del estándar β -caroteno: Tipo II, Sigma $\geq 95\%$ (C4582-25 mg): Romper la ampolla del estándar con mucho cuidado, disolver todo su contenido con hexano grado HPLC y aforar a 250 ml. La concentración final es 100 ppm. Guardar en congelación en un envase completamente cerrado y protegido de la luz.

Solución estándar de β -caroteno 10 ppm: Tomar 1 ml de la solución patrón de 100 ppm y aforar a 10 ml con hexano grado HPLC.

Curva de calibración del estándar de β -caroteno para la cuantificación por el espectrofotómetro UV-VIS: A partir de la solución de 10 ppm, preparar una curva de 0 - 3 $\mu g/ml$ y medir en el espectrofotómetro UV-VIS inmediatamente.

d) Procedimiento

- Pesar 0,6 a 1 gramos de muestra liofilizada en un vial con tapa y protegido de la luz (forrado con papel aluminio).
- Adicionar 0,12 g de carbonato de magnesio. Adicionar 10 ml de la mezcla etanol : hexano. Agitar por 30 minutos en una placa agitadora
- Trasvasar el contenido a tubos completamente protegidos de la luz y centrifugar por 10 minutos a 3500 rpm

- El sobrenadante trasvasar a un embudo de separación completamente protegido de la luz; sobre el residuo añadir 10 ml de la mezcla etanol: hexano
- Agitar por 3 minutos y centrifugar. Sobre el residuo adicionar 10 ml de etanol
- Agitar por 3 minutos y centrifugar. En el residuo adicionar 10 ml de hexano.
- Agitar por 3 minutos y centrifugar.
- El sobrenadante que queda después de cada centrifugación trasvasar a un embudo de separación, lavar dos veces con 20 ml de una solución de cloruro de sodio al 10 % y tres veces con 20 ml de agua destilada.
- La fase acuosa se desecha. Sobre la fase de hexano adicionar sulfato de sodio anhidro para eliminar completamente el agua y el extracto pasar a viales completamente protegidos de la luz.
- Llevar a sequedad con nitrógeno a 40° C.
- Recuperar los carotenoides con 3 ml de hexano grado HPLC.
- De los carotenoides recuperados tomar directamente o de la dilución y leer inmediatamente en el espectrofotómetro UV-VIS a 450 nm para cuantificar la concentración de carotenoides totales.

NOTA: Para evitar la degradación de los carotenoides se debe trabajar en un cuarto oscuro y protegido de la luz

e) Cálculos. Cuantificación colorimétrica por Espectrofotometría UV-VIS

$$\text{CarotenoidesTotales}(\mu\text{g} / \text{g}) = \frac{LR * Vt}{Pm}$$

Donde:

LR = Concentración de β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Vt = Volumen total (ml)

Pm = Peso de la muestra (g)

f) Referencias

CLAUDIE, D; CATHERINE, C; PATRICK, O; FRANCK, C; MARIE A., 2005, "Varietal and Interspecific influence on Micronutrient Contents in Citrus from the Mediterranean Area", Journal of Agricultural and Food, Chemist, Vol 53, p 214. Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP.

DETERMINACIÓN DE MINERALES

a) Principio

La ceniza de la muestra es sometida a una digestión ácida para luego ser diluido a un volumen determinado. Posteriormente se realiza los análisis de macro y micro - elementos por absorción atómica y en el caso de fósforo por colorimetría.

b) Equipo y material

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica , Shimadzu AA-680
- Espectrofotómetro, Spectronic 20D
- Tubos (celda), Spectronic 20D
- Balanza analítica de 500 g, BOECO Placa agitadora
- Dilutor automático
- Plancha calentadora, Thermolyne
- Agitador de tubos Mix II, Thermolyne
- Balones aforados, Pipetas volumétricas, Pipetas graduadas, Kimax
- Papel filtro cuantitativo, Whatman 541
- Embudos, Kimax
- Tubos de ensayo, Kimax

c) Reactivos

Acido clorhídrico: HCl 37 %.

Acido nítrico: HNO₃ 65 %.

Solución de referencia de 1.000 ppm de: calcio, magnesio, sodio, potasio, cobre, manganeso, zinc, hierro, cobre.

Solución estándar de calcio 10 ppm, de magnesio 1 ppm.

Solución de lantano 1 %: Pesar 17,65 g de cloruro de lantano, disolver con 400 ml de agua y aforar a 1000 ml.

Solución estándar de fósforo 1.000 ppm.

Solución estándar de fósforo 10 ppm de fósforo.

Solución de molibdo-vanadato: Pesar 25 gramos de molibdato de amonio en 400 ml de agua bidestilada, 1,25 g de vanadato de amonio en 30 ml de agua destilada caliente y enfriar. Añadir 250 ml de ácido nítrico al 65 % con agitación lenta. Mezclar la solución de molibdato con el vanadato y aforar a un litro, envasar en frasco ámbar.

Solución de litio al 1 %: Pesar 62,34 g de cloruro de litio y disolver con 400 ml de agua bidestilada y aforar a 1000 ml.

Solución estándar de sodio 2 ppm, de potasio 4 ppm, de hierro 10 ppm.

d) Procedimiento

- Colocar los crisoles que contienen las cenizas en la capilla o sorbona, adicionar 10 ml de agua destilada y 5 ml de ácido clorhídrico concentrado, digerir hasta que el volumen se reduzca a la tercera parte a temperatura baja.
- Retirar los crisoles de la plancha y enfriar, filtrar usando papel filtro cuantitativo y recibir el filtrado en un balón de 100 ml. Aforar con agua bidestilada.

d1) Determinación de calcio y magnesio

- Tomar 0,5 ml del filtrado, añadir 4 ml de agua bidestilada, 0,5 ml de la solución de lantano al 1 % y agitar.
- De esta solución tomar 0,5 ml, añadir 4 ml de agua bidestilada, 0,5 ml de la solución de lantano y agitar.
- Preparar la curva estándar de Ca y Mg de 5 y 0,5 ppm: Colocar en tubos de

ensayo la solución estándar de calcio y magnesio 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml, adicionar agua bidestilada hasta 9 ml y añadir 1 ml de la solución de lantano al 1 %.

- Leer en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama, tomando en cuenta primero los estándares luego las muestras.

d1.1) Cálculos

$$Ca(\%) = \frac{LR * Fd}{Pm}$$

Donde:

- LR = Lectura de Regresión
- Fd = Factor de dilución
- Pm = Peso de la muestra (g)

d2) Determinación de fósforo

- Tomar 0,5 ml del filtrado en un tubo de ensayo, añadir 4 ml de agua bidestilada y 0,5 ml de la solución molibdo -vanadato y agitar.
- Cuando se requiera hacer más diluciones se tomará 4,5 ml de agua con 0,5 ml de muestra y en la dilución a leerse se pondrá 0,5 ml de muestra 0,5 de la solución de molibdo - vanadato y 4 ml de agua bidestilada
- Preparar la curva estándar de fósforo de 0 a 5 ppm: Colocar la solución estándar de fósforo 10 ppm en tubos de ensayo 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml, adicionar agua bidestilada hasta 9 ml y luego 1 ml de la solución de molibdo – vanadato.
- Pasar a los tubos calibrados del espectrofotómetro y leer, tomar en cuenta primero los estándares luego las muestras.
- Medir a una longitud de ondas de 400 nm.

d2.1) Cálculos

$$P(\%) = \frac{C * Fd}{Pm}$$

Donde:

- C = Concentración (ppm)
- Fd = Factor de dilución
- Pm = Peso de la muestra (g)

d3) Determinación de sodio y potasio

- Tomar 0,5 ml del filtrado en un tubo de ensayo, añadir 4 ml de agua bidestilada y 0,5 ml de la solución de litio al 1 % y agitar.
- Tomar 0,5 ml añadir 4 ml de agua bidestilada y 0,5 ml de la solución de litio al 1 % y agitar.
- Preparar la curva estándar de sodio y potasio de 1 y 2 ppm: Colocar en tubos de ensayo la solución estándar de Na y K 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml, y adicionar agua bidestilada hasta 9 ml y adicionar 1 ml de la solución de litio al 1 %.
- Leer en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama, tomando en cuenta primero los estándares luego las muestras.

d3.1) Cálculos

$$Na(\%) = \frac{C * Fd}{Pm}$$

Donde:

- C = Concentración (ppm)
 Fd = Factor de dilución
 Pm = Peso de la muestra (g)

d4) Determinación de hierro

- Preparar la curva estándar de hierro de 0 a 5 ppm: Colocar en tubos de ensayo la solución estándar de hierro 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml, adicionar agua bidestilada hasta 9 ml y adicionar 1 ml de la solución de lantano al 1 %.
- Tomar 5 ml de la muestra y leer en el espectrofotómetro de absorción atómica
- En caso de ser lecturas altas, realizar diluciones de 1/10.

d4.1) Cálculos

$$Fe(\%) = \frac{C * Fd}{Pm}$$

Donde:

- C = Concentración (ppm)
 Fd = Factor de dilución
 Pm = Peso de la muestra (g)

d5) Determinación de cobre, manganeso y cinc

- Tomar 10 ml de la solución madre, agitar y leer
- Preparar la curva estándar de cobre, manganeso y zinc de 5 y 0.5 ppm: Colocar en tubos de ensayo la solución estándar de calcio y manganeso 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml, y adicionar agua bidestilada hasta 9 ml y adicionar 1 ml de la solución de lantano al 1.
- Leer en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama, primero los estándares luego las muestras.

d5.1) Cálculos

$$Cu(ppm) = \frac{LR * Fd}{Pm}$$

Donde:

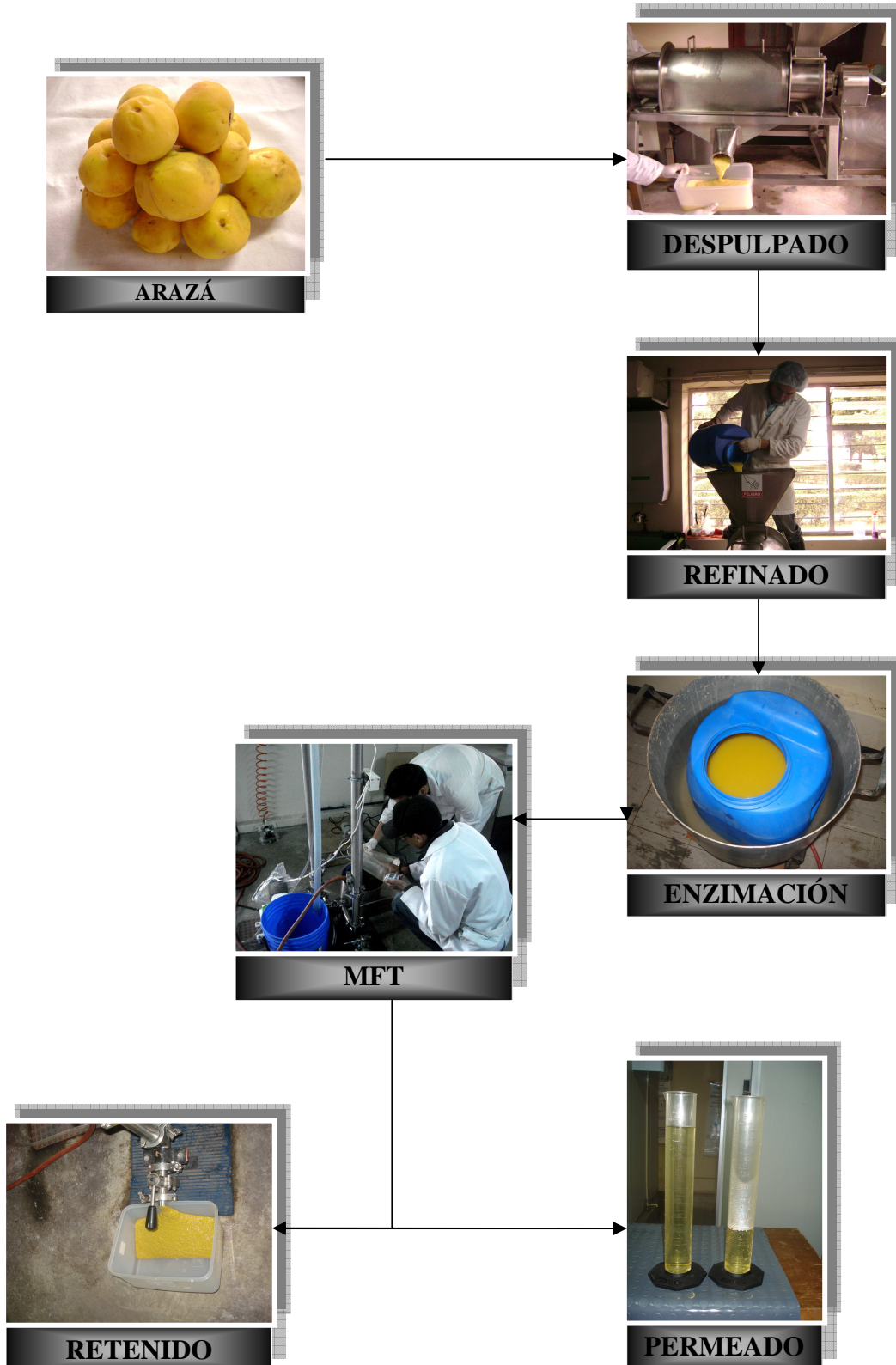
- LR = Lectura de Regresión
 Fd = Factor de dilución
 Pm = Peso de la muestra

e) Referencias

FICK, K.; MCDOWELL, L.; MILES P.; WILKINSON, N.; FUNK, J.; CONRAD, J., 1979, "Manual de Métodos de Análisis de Minerales para tejidos de planta y animales", Adaptado en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, Departamento de Ciencia Animal, 2da Edición. EE.UU. Universidad de Florida.

ANEXO C

ESQUEMATIZACIÓN FOTOGRÁFICA DEL PROCESO PARA OBTENER EL JUGO CLARIFICADO DE ARAZÁ



ANEXO D

EVALUACIÓN SENSORIAL DUO - TRIO

Nombre: _____

Fecha: _____

Producto: Pulpa de Arazá

Instrucciones:

Dentro de los productos que se le están presentando, tiene usted una muestra de control, rotulada con R y dos muestras codificadas de diferente manera. ¿Cuál de las muestras codificadas es similar de R (Marque una X)?

Referencia (R)



Código 7021



Código 8700



Observaciones

.....

.....

.....

.....

.....

MUCHAS GRACIAS.....

PRUEBA DE PREFERENCIA

NOMBRE:.....

FECHA:.....

PRODUCTO: Jugo clarificado y pulposo de arazá

Instrucciones:

Por favor pruebe el producto con código 259. A continuación pruebe el producto con código 891. Ahora que ha probado ambos productos, ¿Prefiere alguno o los dos?

259.....

891.....

Comentarios.....
.....
.....

ANEXO E

Tabla 4. Probabilidad de x o mas juicios correctos en n pruebas ($p=1/3$)

		Respuestas Correctas																		
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
N° Total de panelistas	5	0,210	0,045	0,004																
	6	0,320	0,100	0,018	0,001															
	7	0,420	0,173	0,048	0,007															
	8	0,532	0,259	0,880	0,020	0,003														
	9	0,623	0,360	0,145	0,042	0,008	0,001													
	10	0,701	0,441	0,213	0,077	0,020	0,003													
	11	0,766	0,527	0,289	0,122	0,039	0,009	0,001												
	12	0,819	0,607	0,368	0,178	0,066	0,019	0,004	0,001											
	13	0,861	0,678	0,448	0,241	0,104	0,035	0,009	0,002											
	14	0,895	0,739	0,524	0,310	0,149	0,058	0,017	0,004	0,001										
	15	0,921	0,791	0,596	0,382	0,203	0,088	0,031	0,008	0,002										
	16	0,941	0,834	0,661	0,453	0,263	0,126	0,050	0,016	0,004	0,001									
	17	0,956	0,870	0,719	0,522	0,326	0,172	0,075	0,027	0,008	0,002									
	18	0,967	0,898	0,769	0,588	0,391	0,223	0,108	0,430	0,014	0,004	0,001								
	19	0,976	0,921	0,812	0,648	0,457	0,279	0,146	0,065	0,024	0,007	0,002								
	20	0,982	0,940	0,848	0,703	0,521	0,339	0,191	0,092	0,038	0,013	0,004	0,001							
	21	0,987	0,954	0,879	0,751	0,561	0,399	0,240	0,126	0,056	0,021	0,007	0,002							
	22	0,991	0,965	0,904	0,794	0,638	0,460	0,293	0,163	0,079	0,033	0,012	0,003	0,001						
	23	0,993	0,974	0,924	0,831	0,690	0,519	0,349	0,206	0,107	0,048	0,019	0,006	0,002						
	24	0,996	0,980	0,941	0,862	0,737	0,576	0,406	0,254	0,140	0,068	0,025	0,010	0,003	0,001					
	25	0,996	0,985	0,954	0,888	0,778	0,630	0,462	0,304	0,178	0,092	0,042	0,016	0,006	0,002					
	26	0,997	0,989	0,984	0,910	0,815	0,679	0,518	0,367	0,220	0,121	0,068	0,025	0,009	0,003	0,001				
	27	0,998	0,992	0,972	0,928	0,847	0,725	0,572	0,411	0,268	0,154	0,079	0,036	0,014	0,005	0,002				
	28	0,999	0,994	0,979	0,943	0,874	0,765	0,623	0,464	0,314	0,191	0,104	0,050	0,022	0,006	0,003	0,001			
	29	0,999	0,996	0,984	0,955	0,897	0,801	0,670	0,517	0,364	0,232	0,133	0,068	0,031	0,013	0,005	0,001			
	30	0,999	0,997	0,988	0,965	0,916	0,833	0,714	0,568	0,415	0,276	0,166	0,090	0,043	0,019	0,007	0,002	0,001		
	31		0,998	0,991	0,972	0,932	0,861	0,754	0,617	0,466	0,322	0,203	0,115	0,059	0,027	0,011	0,004	0,001		
	32		0,998	0,993	0,978	0,946	0,885	0,789	0,662	0,516	0,370	0,243	0,144	0,078	0,038	0,016	0,006	0,002	0,001	
	33		0,999	0,995	0,983	0,957	0,905	0,821	0,705	0,565	0,419	0,285	0,177	0,100	0,051	0,023	0,010	0,004	0,001	
	34		0,999	0,996	0,987	0,966	0,922	0,849	0,744	0,612	0,468	0,330	0,213	0,126	0,067	0,033	0,014	0,006	0,002	
	35		0,999	0,997	0,990	0,973	0,937	0,873	0,779	0,656	0,516	0,376	0,252	0,155	0,087	0,044	0,020	0,009	0,003	