

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

# **Estudio preliminar del efecto de la microfiltración tangencial sobre la capacidad antioxidante en jugos de fruta clarificados**

Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria en el Grado  
Académico de Licenciatura.

Presentado por

**Heidy Lorena Cáceres Montoya**

**Honduras**  
Diciembre, 2003

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Heidy Lorena Cáceres Montoya

**Honduras**  
Diciembre, 2003

# **Estudio preliminar del efecto de la microfiltración tangencial sobre la capacidad antioxidante en jugos de fruta clarificados**

Presentado por

Heidy Lorena Cáceres Montoya

Aprobado:

---

Gladys Flores, M.Sc.  
Asesora Principal

---

Claudia García, Ph.D.  
Coordinadora de la Carrera  
de Agroindustria

---

Ana Mercedes Pérez, Ph.D.  
Asesora, CITA/UCR

---

Antonio Flores, Ph.D.  
Decano Académico

---

Fabrice Vaillant, Ph.D.  
Asesor, CITA/CIRAD

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A mi familia y a todas las personas que me ayudaron a desarrollar este proyecto en Costa Rica, al equipo del laboratorio de química del CITA, Adolfo, Marisol, Marielos, Pedro, Luis, y a mis asesores Ana Mercedes, Fabrice y Gladys por el cariño, paciencia y apoyo constante .

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por todas las bendiciones con las que me ha colmado a lo largo de mi vida. A mis padres y mi hermana por todo el amor y apoyo que me han brindado. A mi familia por la confianza y cariño. A mi prima Victoria por ser mi guía y ejemplo.

A la Lic. Gladys por su cariño, paciencia y todas las enseñanzas que en mí dejo para la vida.

A la Dra. Ana Mercedes Pérez y el Dr. Fabrice Vaillant, por el apoyo, confianza y tiempo dedicado para la realización de mi proyecto especial.

A todos mis compañeros y amigos del CITA, en especial a Adolfo por todo lo que me enseñó y por una amistad sincera, a Marisol, Pedro, Marielos, Luis, Gabriela y Glorya, espero volver a verlos.

A la familia Solís Ruballos por todo el cariño y comprensión.

A mis compañeros Zamoranos por todas las experiencias y recuerdos que estarán siempre en mi mente y corazón.

## **AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES**

Al Fondo Dotal Hondureño y al Ministerio de Agricultura por el financiamiento brindado durante mis cuatro años de estudio.

Al proyecto CIRAD-FHLOR por el financiamiento de mi proyecto de graduación.

## RESUMEN

Cáceres, Heidy. 2003. Estudio preliminar del efecto de la microfiltración tangencial sobre la capacidad antioxidante en jugos de fruta clarificados. Trabajo de graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 40p.

Las frutas tropicales tienen una participación del mercado internacional de 27%; de esto el 60% se consume fresco, 30% se procesa y 10% se exporta. El melón y la mora generan abundante fruta de descarte, al no cumplir con los parámetros de exportación. Ambas son ricas en pigmentos y compuestos antioxidantes que reducen el daño oxidativo celular, beneficiando la salud. Un método innovador de aprovechamiento de fruta descartada es la producción de jugos clarificados (permeados), mediante la microfiltración tangencial (MFT). Este estudio preliminar evaluó el efecto de la MFT sobre la capacidad antioxidante de jugos clarificados de melón y mora, monitoreando los flujos de permeado y cuantificando antocianinas, carotenoides, polifenoles totales, vitamina C y la capacidad de absorber radicales de oxígeno (ORAC), en los permeados y retenidos a los 0, 20, 40 y 60 minutos de MFT. Se efectuaron dos ensayos con cada fruta, utilizando membrana de porosidad  $0.2\mu$  y un ensayo con mora utilizando membrana de  $0.5\mu$ . Los ensayos en melón mostraron flujos variables debidos a colmatación seguida de barrido de partículas; los carotenoides y polifenoles tendieron a quedarse en el retenido; la vitamina C se oxidó a ácido dehidroascórbico por almacenaje prolongado; los valores de ORAC fueron muy bajos y debidos exclusivamente al extracto cetónico. Los ensayos en mora mostraron flujos descendentes por colmatación; los flujos fueron mayores y el tiempo de MFT fue menor con membrana de porosidad  $0.5\mu$ ; las antocianinas pasaron al permeado por ser hidrosolubles; los polifenoles totales mostraron valores similares para el retenido y permeado; la vitamina C se oxidó a ácido dehidroascórbico durante el almacenaje; los valores de ORAC fueron similares en los extractos acuoso y cetónico. Se recomienda establecer parámetros óptimos de MFT para mora, por su alto contenido de pectinas, y evaluar inmediatamente la vitamina C y ORAC en las muestras.

**Palabras clave:** flujos, ORAC, permeado, pigmentos, retenido y vitamina C.

## CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Contenido.....	viii
	Índice de Cuadros.....	xi
	Índice de Figuras.....	xii
	Índice de Anexos.....	xv
1..	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1	<b>OBJETIVOS</b> .....	2
1.1.1	Objetivo general.....	2
1.1.2	Objetivos específicos.....	2
2.	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
2.1	<b>PRINCIPIO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL</b> .....	3
2.2	<b>TIPOS DE MEMBRANAS</b> .....	5
2.3	<b>JUGOS CLARIFICADOS</b> .....	5
2.4	<b>FACTORES QUE AFECTAN EL FLUJO EN MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL</b> .....	6
2.4.1	pH y fuerza iónica.....	6
2.4.2	Tamaño de partícula de la solución a filtrar.....	6
2.4.3	Colmatación de la membrana.....	6
2.5	<b>FRUTAS</b> .....	7
2.5.1	Melón.....	7
2.5.2	Mora.....	8
2.6	<b>PIGMENTOS</b> .....	9
2.6.1	Antocianinas.....	9
2.6.2	Carotenoides.....	9
2.6.3	Polifenoles totales.....	9
2.7	<b>VITAMINA C</b> .....	10
2.8	<b>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	10
3.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
3.1	<b>LOCALIZACIÓN</b> .....	11

3.2	MATERIALES.....	11
3.3	EQUIPO.....	11
3.4	MÉTODOS.....	11
3.4.1	Microfiltración tangencial.....	11
3.4.1.1	Proceso de microfiltración tangencial.....	12
3.4.1.2	Medición de flujos de permeado y toma de muestras.....	13
3.4.2	Análisis de pigmentos.....	13
3.4.2.1	Carotenoides.....	13
3.4.2.2	Antocianinas.....	13
3.4.2.3	Polifenoles totales.....	13
3.4.3	Determinación de vitamina C.....	13
3.4.4	Determinación de la capacidad antioxidante.....	13
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	14
4.1	FLUJOS DE PERMEADO EN LA MICROFILTRACION TANGENCIAL.....	14
4.1.1	Jugo de melón.....	14
4.1.2	Jugo de mora.....	16
4.2	CONTENIDO DE CAROTENOIDES, ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES TOTALES EN EL JUGO CLARIFICADO Y EN EL RETENIDO.....	18
4.2.1	Jugo de melón.....	18
4.2.1.1	Carotenoides.....	18
4.2.1.2	Polifenoles totales.....	19
4.2.2	Jugo de mora.....	21
4.2.2.1	Antocianinas.....	21
4.2.2.2	Polifenoles totales.....	23
4.3	CONTENIDO DE VITAMINA C EN EL JUGO DE FRUTA Y CLARIFICADO DE MELÓN Y MORA.....	25
4.4	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EL JUGO DE FRUTA Y CLARIFICADO DE MELÓN Y MORA.....	26
4.4.1	Jugo de melón.....	26
4.4.2	Jugo de mora.....	27
5.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	29
6.	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	30

7.	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	31
8.	<b>ANEXOS.....</b>	33

**ÍNDICE DE CUADROS**

## Cuadro

1.	Composición química del melón.....	8
2.	Composición química de la mora.....	9
3.	Contenido de ácido dehidroascórbico (DHA) en jugo de melón.....	25
4.	Contenido de ácido dehidroascórbico (DHA) en jugo de mora.....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1.	Esquema comparativo entre la filtración frontal y tangencial.....	3
2.	Esquema del modo de operación en microfiltración tangencial.....	4
3.	Diagrama de flujo para microfiltración tangencial.....	12
4.	Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el primer ensayo de MFT de melón utilizando membrana con poro 0.2 $\mu$ .....	14
5.	Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el segundo ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ .....	15
6.	Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el primer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ .....	16
7.	Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el segundo ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ .....	17
8.	Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el tercer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de 0.5 $\mu$ .....	17
9.	Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de carotenoides usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el primer ensayo.....	18
10.	Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de carotenoides usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ . en el segundo ensayo.....	19
11.	Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el primer ensayo.....	20

12.	Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el segundo ensayo.....	20
13.	Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de antocianinas (mg /L) usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el primer ensayo.....	21
14.	Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de antocianinas (mg/L) usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el segundo ensayo.....	22
15.	Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de antocianinas (mg /L) usando membrana con porosidad de 0.5 $\mu$ en el tercer ensayo.....	22
16.	Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el primer ensayo.....	23
17.	Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ en el segundo ensayo.....	24
18.	Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de 0.5 $\mu$ en el tercer ensayo.....	24
19.	Capacidad antioxidante total expresada en $\mu\text{M. L}^{-1}$ de trolox, para el primer ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ .....	26
20.	Capacidad antioxidante total expresada en $\mu\text{M. L}^{-1}$ de trolox, para el segundo ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ .....	27
21.	Capacidad antioxidante total expresada en $\mu\text{M. L}^{-1}$ de trolox, para el primer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de 0.2 $\mu$ .....	27

22.	Capacidad antioxidante total expresada en $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ de trolox, para el segundo ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de $0.2\mu$ .....	28
23.	Capacidad antioxidante total expresada en $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ de trolox, para el tercer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de $0.5\mu$ .....	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

1.	Ciclo de lavado de la membrana del microfiltrador.....	34
2.	Determinación de antocianinas.....	35
3.	Determinación de carotenoides.....	36
4.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	37
5.	Determinación de los fenoles totales.....	40

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, en el mercado internacional, las frutas tropicales tienen una participación de mercado del 27%; a su vez, cabe recalcar que en la última década, las frutas tropicales presentaron una mayor dinámica, ya que crecieron a una tasa anual promedio de 5.3%, seguidas por las uvas (6%) y las bayas (4.7%) (Ministerio de Agricultura Colombiano, 2003).

Según cifras del Manual del Exportador de Frutas, Hortalizas y Tubérculos en Colombia, elaborado por la Corporación Colombia Internacional, alrededor del 60% de la producción mundial de frutas y hortalizas se consume en fresco; en los mismos países productores, el 30% lo demanda la industria para procesamiento y el restante 10% se comercializa en los mercados internacionales. En cuanto al comercio mundial de productos procesados de frutas, se tiene una participación del 68% (Ministerio de Agricultura Colombiano, 2003).

En el presente estudio las frutas investigadas son el melón y la mora, los cuales se producen en los países del trópico de América, de las que se genera un alto porcentaje de fruta descartada al no cumplir con los parámetros de exportación. Dichas frutas son ricas en pigmentos y compuestos antioxidantes, cuyos efectos benéficos se deben a su capacidad de reducir el daño oxidativo de las células en el cuerpo humano.

En la actualidad, gracias a estudios llevados a cabo, se conoce que la oxidación de las moléculas biológicas se relaciona con la génesis de la aterosclerosis, cáncer, diabetes, la enfermedad de Alzheimer y con el proceso de envejecimiento (Proyecto Ciencia, Vino y Salud, 2003).

Una de las opciones más innovadoras y utilizadas en la industria moderna, como método de aprovechamiento de la materia prima de descarte, es la producción de jugos clarificados de frutas mediante la aplicación de la microfiltración tangencial (MFT). Con este proceso se eliminan muchas etapas empleadas en la filtración convencional, tales como la centrifugación, la decantación y la filtración frontal, generando los mismos resultados y reduciendo el tiempo de proceso (Vaillant, 2000).

Entre las principales aplicaciones de MFT se pueden citar su uso en la industria láctea (para concentración de leche descremada o entera), producción de jugos de frutas clarificados, producción de vino y cerveza, extracción de colorantes y saborizantes naturales y biotecnología (purificación de enzimas extraídas de plantas y animales).

La mayoría de experimentos se han llevado a cabo en la producción de jugo de manzana clarificado (Pepper, 1987), resultando un permeado en el que se obtuvo una notable contribución en la claridad, color, sabor y estabilidad del producto.

La técnica es usada en el ámbito mundial en frutas como uva, manzana y pera; y ahora se está implementando en América Latina para el procesamiento de frutas tropicales, que en su mayoría se caracterizan por su alto contenido de pulpa (Colciencias, 2003).

Dentro de las instituciones pioneras en investigación en el desarrollo de tecnologías de membranas, como la microfiltración tangencial, en América Latina está el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Esta entidad pertenece a la Universidad de Costa Rica (UCR) que, con la ayuda del Convenio con el Centro Internacional de Cooperación en Investigación Agronómica (CIRAD) para el Desarrollo de Francia, han llevado a cabo estudios en todo lo relacionado al procesamiento de frutas y hortalizas.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la microfiltración tangencial sobre la capacidad antioxidante en jugos de frutas clarificados de melón y mora.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Medir los flujos de microfiltración de melón y mora con membrana de 0.2 y 0.5  $\mu$ . Determinar el contenido de carotenoides, antocianinas y polifenoles totales en el jugo clarificado y en el retenido de los jugos de melón y de mora.
- Determinar el contenido de vitamina C en los jugos de melón y de mora y en sus jugos clarificados.
- Determinar la capacidad antioxidante (ORAC) en los jugos de melón y mora y en sus jugos clarificados de melón y de mora.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 PRINCIPIO DE MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL

La microfiltración tangencial (MFT) comenzó con el desarrollo de la ósmosis inversa por Sourirajan en el año de 1959 (Paulson *et al.*, 1984) y es una de las tecnologías de membrana más utilizadas en los últimos años, aparte de la ultrafiltración y nanofiltración.

La tecnología consiste en la separación de componentes de un fluido alimentado que se mueve paralela o tangencialmente a la superficie de la barrera, la acción de arrastre o barrido de éste minimiza la acumulación de especies rechazadas por la membrana y posterior formación de la torta sobre la superficie, de esta forma se logra un índice de filtración más alto que para sistemas que utilizan la configuración frontal.

El permeado es la fracción que ha atravesado la membrana semipermeable y es recolectada en el lado opuesto de la membrana; la porción del flujo alimentado que ha sido enriquecida con los solutos o sólidos suspendidos, que no pasaron a través de la membrana, es llamada retenido o concentrado. Este puede ser recirculado a través del sistema para extraer la mayor cantidad posible de permeado, con lo cual se logra un índice de filtración mayor que los obtenidos en la filtración convencional. El retenido o concentrado corre a través del mismo canal de flujo por donde lo hace el flujo alimentado, arrastrando soluto concentrado (Salas, 2003).

Los métodos tradicionales de filtración emplean coadyuvantes como gelatinas, bentonita, o “kiesesol” (material sintético de sílica y ácido tánico) para flocular las moléculas de alto peso molecular. Posteriormente se filtra la solución por un lecho de tierra de diatomeas para refinar el clarificado (Salas, 2003). La Figura 1 muestra un esquema comparativo entre la filtración frontal y la tangencial.

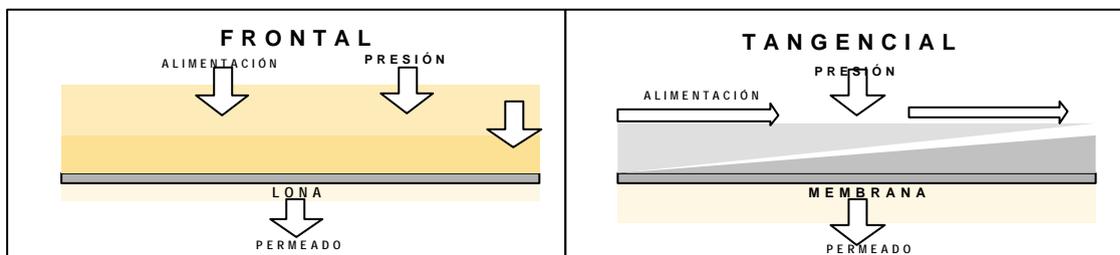


Figura 1. Esquema comparativo entre la filtración frontal y tangencial  
Fuente: Salas (2003).

En microfiltración tangencial (MFT), la alimentación es enviada a través de un tanque del módulo de la membrana utilizando una bomba. La presión a través de la membrana, conocida como presión transmembranaria, se calcula sumando la presión del interior de la membrana mas la de salida de la membrana menos la presión del permeado (la cual es muy cercana a cero) y la sumatoria es dividida entre dos.

A través de la bomba se regula la presión del fluido de alimentación y la temperatura se controla a través de intercambiadores de calor o manteniendo la temperatura directamente (no mayor a 35 °C) sobre el tanque de alimentación.

El retenido es concentrado ya que al hacer recircular el retenido mas el flujo de alimentación, a través de la membrana, crea un efecto de arrastre de partículas. La concentración del retenido puede ser expresada como el factor de reducción volumétrica (FRV) (Salas, 2003). La Figura 2 muestra un esquema del modo de operación en microfiltración tangencial.

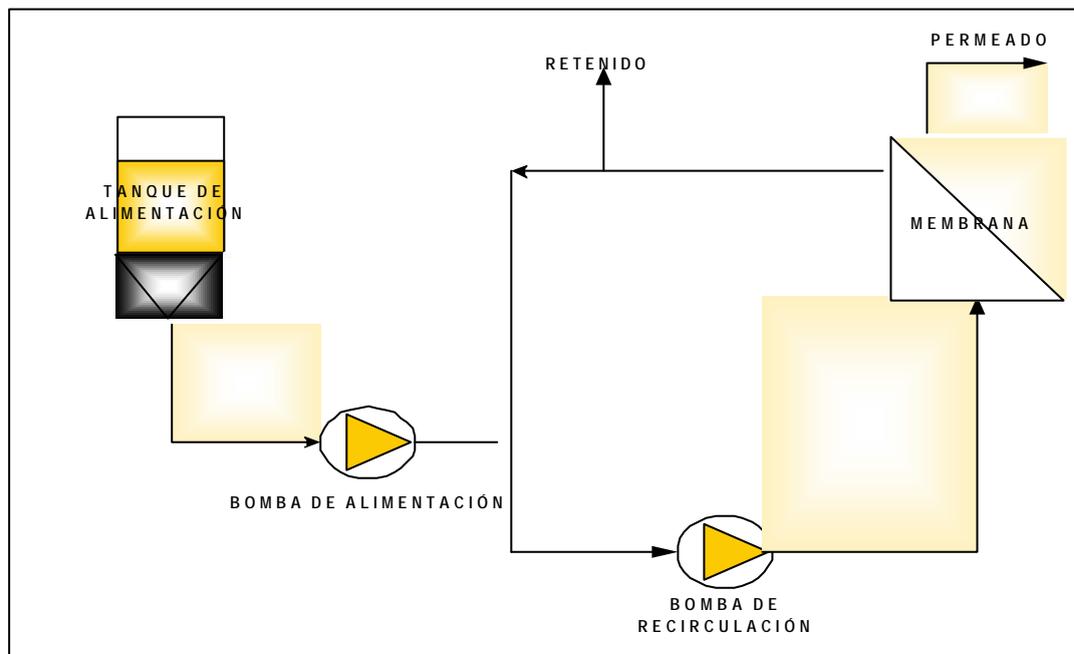


Figura 2. Esquema del modo de operación en microfiltración tangencial  
Fuente: Salas (2003).

Por lo general es necesario reducir el volumen del retenido para optimizar la cantidad de permeado (jugo clarificado obtenido), que es medido a través del FRV; éste es la relación del volumen de alimentación al volumen de retenido (Girard *et al.*, 2000; citado por Salas, 2003).

La bomba de alimentación puede ser diseñada para operar a baja velocidad, lo cual permite que la bomba de recirculación trabaje a alta velocidad, reduciendo así las pérdidas de energía en la etapa de bombeo (Girard *et al.*, 2000; citado por Salas, 2003).

Dentro de las mayores limitaciones de la microfiltración tangencial, se pueden mencionar que existe un límite para la máxima concentración de los solutos y hay una reducción del flujo causado por la formación de la capa de colmataje en la membrana, por efecto de solutos concentrados.

## **2.2 TIPOS DE MEMBRANAS**

Existen membranas asimétricas llamadas anisotrópicas, caracterizadas por ser delgadas y selectivamente permeables, su funcionamiento se asemeja al de una esponja. Actualmente las membranas pueden estar hechas de polímeros orgánicos, cerámica, minerales depositados en cerámica o materiales inertes como óxido de aluminio, grafito, acero inoxidable y carburo de silicio (Belleville *et al.*, 1991; citado por Salas, 2003). La selección de la misma depende de factores como el pH del flujo de alimentación, temperatura, presión y compatibilidad química de la membrana.

## **2.3 JUGOS CLARIFICADOS**

La mayor aplicación de la microfiltración tangencial ha sido en la producción de jugo de manzana clarificado (Pepper, 1987). El jugo es clarificado por remoción de los sólidos insolubles en suspensión, llamados comúnmente “pulpa”, que contienen polisacáridos parietales como sustancias pécticas, celulosa, hemicelulosa, lignina y otros constituyentes menores (proteínas de constitución, ácidos fenólicos, taninos, etc.). Estos causan oscurecimiento en el producto final obtenido (permeado) y para removerlos se utilizan enzimas, que facilitan el procesamiento al mejorar el flujo e impedir que dichos compuestos se acumulen como impurezas en la membrana.

Menos del 70% de la cantidad de enzima es requerida en procesos continuos, ya que la misma recircula en el sistema. Una de sus principales funciones es remover taninos y compuestos que causan oscurecimiento (reacción de Maillard), y a la vez mantener el color y sabor del jugo.

La filtración por membrana a la vez remueve microorganismos perjudiciales eliminando la necesidad de pasteurizar, por lo que se le llama “esterilización fría”; esto preserva a la vez los compuestos volátiles y permite que el jugo se pueda empacar asépticamente. Además brinda mayores rendimientos (95-98%) que los métodos tradicionales (90-93%) que poseen más pasos, como mantenimiento, centrifugación y filtración (Dziezak, 1990).

La importancia en el desarrollo de nuevos productos, con base en jugos clarificados, radica en que éstos puedan mantener sus características físicas y sensoriales, que sirvan como materia prima para productos como por ejemplo: bebidas burbujeantes clarificadas para bebidas alcohólicas, aguas aromáticas, té frío con jugos de fruta, bebidas suaves y

cocteles; pastelería con productos tales como las jaleas translúcidas y las mieles de fruta translúcida; frutas enlatadas con jugo clarificado como sirope; productos gelatinosos translúcidos como jaleas y gelatinas; miel de frutas y confitería, entre otros (Vaillant, 2000).

## **2.4 FACTORES QUE AFECTAN EL FLUJO EN MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL**

El comportamiento de los flujos en microfiltración tangencial está determinado por factores tales como:

### **2.4.1 pH y fuerza iónica**

En suspensiones coloidales estables se da el incremento de la doble capa difusa alrededor de las capas cargadas, permitiendo así a las partículas empacarse densamente en la torta y así reducir el flujo de permeado (Salas, 2003).

### **2.4.2 Tamaño de partícula de la solución a filtrar**

La declinación del flujo de permeado será mucho más rápida para suspensiones alimentadas con partículas de menor tamaño; esto se debe a que en la etapa transitoria de la formación de la torta, todas las partículas son transportadas a la superficie de la membrana. El número de partículas de la torta, para una masa de alimentación dada, se incrementa marcadamente con el decremento del tamaño (Salas, 2003).

### **2.4.3 Colmatación de la membrana**

El jugo de la fruta posee tanto compuestos insolubles como solubles; los sólidos insolubles en suspensión (SIS) son en su mayoría fragmentos celulares de las frutas, entre los que se pueden mencionar coloides, fibrillas de celulosa o hemicelulosa y aglomerados fibrosos entre otros. El tamaño y tipo de fragmento depende del método de extracción del jugo (Lozano, 1999).

Aparte de los SIS, hay compuestos solubles que colmatan la membrana y que corresponden principalmente a macromoléculas solubilizadas durante la extracción del jugo; la mayor representante es la pectina, una de las principales colmatantes por su gran poder de gelificación en condiciones de concentración y pH favorables. Las pectinas pueden representar un amplio rango de peso molecular, de 10 a 500 kDa con un peso molecular promedio de 100 kDa (Lozano, 1999).

Usando enzimas se logran moléculas con un peso molecular inferior a 10 kDa, gracias a la hidrólisis de las pectinas (Will, 1992; citado por Salas, 2003), con lo cual se demuestra el potencial de colmatación de las pectinas si no se lleva a cabo una adecuada hidrólisis enzimática. A su vez los compuestos pécticos están asociados con compuestos aromáticos, lo cual puede causar retención de aromas, cuyo efecto (positivo o negativo) depende de los intereses de los clientes.

El fenómeno de colmatación por los compuestos restantes, entre los que se encuentran los productos de la degradación de pectinas, puede corresponder a polisacáridos de alta masa molar como arabinogalactanos y hemicelulosa, entre otras.

## **2.5 FRUTAS**

### **2.5.1 Melón**

Conocida científicamente como *Cucumis melo*. En 1999 se reportó una producción mundial de 18 millones de toneladas y ocupó el cuarto lugar entre las diez frutas con mayores niveles de producción (Corporación Colombia Internacional, 2001).

Según la FAO los principales países productores de melón fueron China, Turquía, Estados Unidos, España, Irán y Rumania, países que además de abastecer sus propios mercados, atienden la demanda externa (Corporación Colombia Internacional, 2001).

El melón para el consumo en estado fresco debe ser de cosecha reciente, firme, compacto y suficientemente desarrollado, presentando color, olor y sabor típicos de la variedad. Las frutas deben estar sanas, libres de plaguicidas y microorganismos patógenos; no deben presentar daños o lesiones de origen físico y mecánico, que afecte la apariencia del producto. La calidad del fruto está relacionada con los sólidos solubles, recomendándose que éstos sean superiores a 10° Brix (CNP, 1997).

Los melones de la variedad “cantaloupe”, de pulpa naranja, se encuentran entre los más nutritivos. Una porción de 100 gramos proporciona más de la mitad de la dosis diaria recomendada de vitamina C (30 mg/100 g), siendo también una buena fuente de beta carotenos.

Los melones con pulpa de color amarillo claro o verde contienen menos vitamina C y beta carotenos que los de pulpa naranja. El alto contenido de agua de esta fruta estimula los riñones para que funcionen con más eficiencia.

Dentro de los beneficios para la salud, posee ligeras propiedades laxantes y una infusión de sus pepitas ha sido utilizada como remedio natural contra los problemas de riñón y vejiga. A continuación en el Cuadro 1, se detalla la composición química del melón.

Cuadro 1. Composición química del melón

Componente	%
Agua	89.80
Proteína cruda	0.88
Extracto etéreo	0.28
Fibra dietética	0.80
Carbohidratos totales	8.40
Ceniza	0.70

Fuente: INCAP (1996).

### 2.5.2 Mora

Es conocida científicamente como *Rubus glaucus* y fue descubierta en 1851 por Hartw y descrita por Benth. Es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y El Salvador (Facultad de Agronomía-México, 2002).

La variedad “castilla” es una de las más utilizadas para procesamiento, ya que es la que tiene menor vida útil. Una vez procesada tiene gran aceptación en el mercado exterior como jugo concentrado; y hay grandes expectativas para el desarrollo de nuevos productos y como materia prima en la fabricación de vinos, brandy, licor, esencias, además de la comercialización del fruto congelado. Se estima que el consumo de mora por parte de la industria de jugos crecerá para los próximos años a una tasa anual del 10% (Colciencias, 2001).

Hay cuatro factores críticos que influyen en la calidad final de la fruta de mora: la manipulación, la temperatura, el tiempo transcurrido desde la cosecha y el tamaño del empaque.

Dentro de los beneficios de esta fruta a la salud se pueden mencionar: buena para el corazón, para la circulación y problemas de la piel, excelente remedio contra la diarrea, poderosas propiedades antioxidantes por su combinación de vitaminas C y E (21 mg/ 100 g y 0.71 mg/ 100 g, respectivamente) y es rica en pectina, una fibra soluble que ayuda a reducir los niveles de colesterol en sangre. A continuación en el Cuadro 2, se detalla la composición química de la mora.

Cuadro 2. Composición química de la mora

<b>Componente</b>	<b>%</b>
Agua	84.40
Proteína cruda	1.20
Extracto etéreo	0.60
Fibra dietética	5.30
Carbohidratos totales	13.20
Ceniza	0.60

Fuente: INCAP (1996).

## **2.6 PIGMENTOS**

### **2.6.1 Antocianinas**

Se clasifican como flavonoides y se les atribuye efecto protector contra los síntomas del envejecimiento y reducción en la aparición de infecciones en el tracto urinario. Están presentes en altas cantidades en los arándanos y grosellas rojas, y en menor cantidad en cerezas, fresas, kiwi y ciruelas (Vasconcellos, 2001).

### **2.6.2 Carotenoides**

Son una subclase de terpenos, constituida por los pigmentos de color amarillo intenso a naranja y rojo, que otorgan el color a muchas frutas y verduras. Su función principal es proteger al organismo disminuyendo el riesgo de enfermedades coronarias, infartos, ceguera y algunos tipos de cáncer. Por su efecto antioxidante algunos podrían retardar el proceso de envejecimiento, mejorar el funcionamiento de los pulmones y disminuir algunas condiciones relacionadas con la diabetes.

Los carotenos alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y epsilon ( $\epsilon$ ) son los únicos que poseen actividad como vitamina A; el más activo es el  $\beta$ -caroteno conocido también como pro vitamina A, ya que se convierte en ella luego de ser metabolizado en el organismo (Vasconcellos, 2001). El  $\beta$ -caroteno tiene 11 enlaces dobles conjugados y las últimas son bicíclicas; es el pigmento que ha sido más investigado en pruebas in vitro (Jones, 2000).

### **2.6.3 Polifenoles totales**

Son compuestos clasificados dentro de los compuestos fenólicos, que a su vez se dividen en flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles, los cuales protegen a las plantas de los daños oxidativos y ejercen los mismos efectos en el organismo humano. Se encuentran presentes en frutas y verduras con coloraciones azul, azul-rojo y violeta. Su característica principal es la habilidad de bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación (Vasconcellos, 2001).

## 2.7 VITAMINA C

La vitamina C, o ácido ascórbico, es un poderoso antioxidante no tóxico y soluble en agua, su presencia en frutas y vegetales puede proveer muchos de los efectos benéficos de estos alimentos.

El ascorbato puede bloquear la formación de compuestos carcinogénicos tales como las nitrosaminas. En un estudio realizado en el que se examinaron 3968 hombres y 6100 mujeres, se comprobó que el consumo de las vitaminas C y E, y de los carotenoides fueron asociados con una considerable prevención de cáncer del pulmón en fumadores y no fumadores (Jones, 2000).

## 2.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes juegan un papel muy importante en el sistema de defensa del organismo en contra de especies reactivas del oxígeno, que son subproductos dañinos causados durante la respiración celular aeróbica. Los antioxidantes son fitonutrientes muy importantes que no son cuantificados en la información nutricional, ya que no hay métodos estándares de cuantificación. Los antioxidantes más comunes presentes en frutas son la vitamina C y E, carotenoides, flavonoides y compuestos que poseen el grupo tiol (SH).

La acción antioxidante de las frutas tiene, básicamente, tres etapas:

1. En el proceso de digestión, donde se producen oxidaciones, la presencia de antioxidantes hidrosolubles y liposolubles es fundamental para la protección de los lípidos.
2. Los lípidos oxidados también son absorbidos en el intestino; pasan a formar parte de estructuras celulares, como membranas, y macromoléculas, como LDL (lipoproteína de baja densidad o colesterol "malo") y dañan las células del organismo.
3. En el plasma, los antioxidantes evitan la oxidación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos, como los que forman parte de las LDL.

En las células, evitan la oxidación del ácido desoxirribonucleico (ADN), molécula que contiene la información genética y de otras estructuras y moléculas.

El ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) es un método que mide la capacidad antioxidante de alimentos al radical peroxil, inducido por 2,2'azobis adiminopropano dihydrochloride (AAPH) a 37°C, utilizando fluoresceína en lugar de la B-PE, cuyo uso fue discontinuado al descubrirse que interactuaba con los polifenoles, proporcionando resultados poco confiables. La fluoresceína indica la pérdida de fluorescencia, lo cual es directamente proporcional al daño producido por su reacción con el radical peroxil. El efecto protector del antioxidante es medido a través de la lectura del área bajo la curva de caída de la fluorescencia. Se utiliza como estándar un tocoferol llamado Trolox, análogo de la vitamina E, soluble en agua (Albertini y Abuja, 1999) y los resultados se expresan como  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox (Equivalentes de trolox).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN

La realización de este proyecto se dio lugar en la planta piloto y en el laboratorio químico del CITA, ubicadas en la Universidad de Costa Rica (UCR), San José de Costa Rica.

#### 3.2 MATERIALES

- Mora fresca variedad “*castilla*”, grado 3 (descarte para exportación), obtenida en APROCAM, San José, Costa Rica.
- Melón fresco variedad “*cantaloupe*”, obtenido en CENADA.
- Pectinasa y hemicelulasa, Rapidasa c 80 de Interenzimas.
- Celulasa y hemicelulasa “Tropical Cloud”.
- Ultrasil 10 y 25 para el lavado de la membrana.

#### 3.3 EQUIPO

- Despulpador con mallas de 20 y 60 mesh.
- Espectrofotómetro marca Shimadzu UV-240.
- Espectrofluorofotómetro Shimadzu.
- Microfiltrador CITA-CIRAD, fabricado por Soluciones Mecánicas Integrales, serial 007/2001, 220 VOLT/60 Hz, (Bogotá, Colombia).
- Membrana de cerámica con 0.2 $\mu$  de porosidad, con un área de 0.22 m<sup>2</sup>.
- Membrana de cerámica con 0.5 $\mu$  de porosidad, con un área de 0.22 m<sup>2</sup>.

### 3.4 MÉTODOS

#### 3.4.1 Microfiltración tangencial

Se realizaron dos corridas de microfiltración tangencial por cada fruta usando membrana con  $0.2 \mu$  de porosidad; además se hizo una corrida con membrana de  $0.5 \mu$  con el jugo de mora únicamente.

##### 3.4.1.1 Proceso de microfiltración tangencial

La MFT se llevó a cabo con parámetros fijos de presión transmbranaria (2 bares) y concentración de enzima (150 ppm) (Chaverri, 2003).<sup>1</sup> A continuación se muestra el diagrama de flujo para el proceso de MFT (Figura 3).

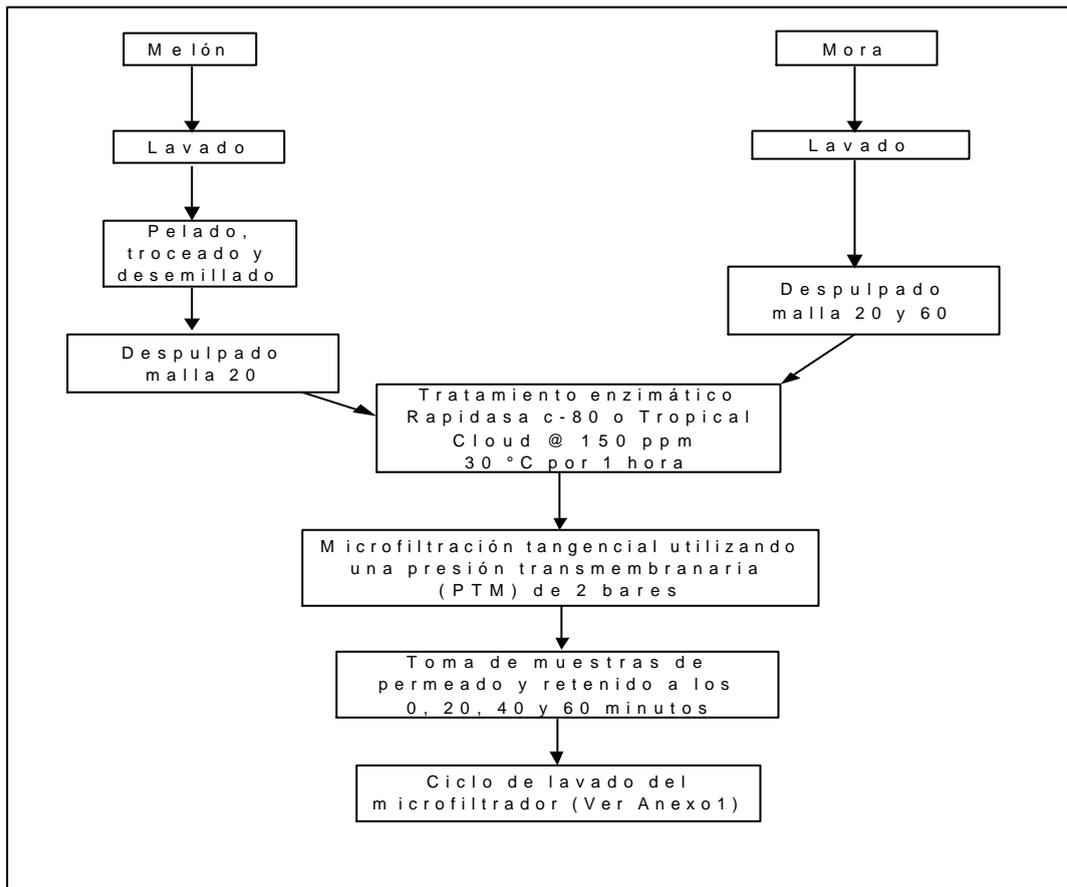


Figura 3. Diagrama de flujo para microfiltración tangencial

<sup>1</sup> Chaverri, M., 2003. Proyecto de graduación: Elaboración de un jugo clarificado de melón por medio de MFT. CITA, Universidad de Costa Rica.

**3.4.1.2. Medición de flujos de permeado y toma de muestras.** En cada ensayo se tomaron muestras del retenido y del permeado a tiempos fijos en el proceso, los cuales fueron a los 0, 20, 40 y 60 minutos para los efectuados con la membrana de porosidad 0.2  $\mu$ . Para el ensayo de mora con membrana 0.5 $\mu$  las muestras se tomaron a los 8, 16, 24 y 32 minutos, ya que la limitante fue la cantidad de materia prima. En dos de los ensayos se tomaron datos del flujo de permeado a intervalos de un minuto, durante toda la corrida; éstos fueron para jugo de melón con membrana 0.2 $\mu$  y para mora con membrana 0.5 $\mu$ .

El tiempo de MFT depende de la cantidad de materia prima inicial, por ejemplo para un lote de 30 litros de jugo la corrida tendría una duración de 60 minutos; dicha cantidad de jugo a su vez está determinada por la capacidad del tanque de alimentación (marmita) y la disponibilidad de materia prima. La cantidad de muestra tomada fue de aproximadamente 250 ml de retenido y de permeado, en envases de vidrio con tapa que se mantuvieron congelados.

### **3.4.2 Análisis de pigmentos**

**3.4.2.1 Carotenoides.** Se analizaron en el jugo, permeado y retenido de melón; los carotenoides se evaluaron como  $\beta$ -caroteno mediante el método colorimétrico de acuerdo a Phillip y Chen, (1988), descrito en el Anexo 2.

**3.4.2.2 Antocianinas.** Fueron analizadas en el jugo, permeado y retenido de mora; éstas son compuestos hidrosolubles cuya cuantificación se hizo según el método 3 de Macarrone *et al.* (2000), descrito en el Anexo 3.

**3.4.2.3 Polifenoles totales.** Estos fueron cuantificados en el jugo, permeado y retenido de ambas frutas; para su determinación se utilizó el método colorimétrico de acuerdo a Singleton y Slinkard (1977), descrito en el Anexo 4.

### **3.4.3 Determinación de vitamina C**

La determinación de Vitamina C, en el jugo de las frutas y en sus permeados, se hizo por HPLC de acuerdo al método analítico de uso interno del CITA.

### **3.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante**

La determinación de la capacidad antioxidante en el jugo de las frutas y en los permeados se hizo a través del método O.R.A.C. (Oxygen radical absorbance capacity) según Cao *et al.* (1996) y descrito en el Anexo 5.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 FLUJOS DE PERMEADO EN LA MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL

A lo largo del proceso de microfiltración utilizando membrana con tamaño de poro  $0.2\mu$  se midió el flujo, manteniendo los parámetros constantes definidos como óptimos (Chaverri, 2003)<sup>2</sup> tales como: presión transmembranaria (2 bares) y cantidad de enzima (150 ppm).

Los resultados mostraron tendencias diferentes en los flujos de permeado, los cuales dependen de la naturaleza de la fruta, de la colmatación y porosidad de la membrana.

#### 4.1.1 Jugo de melón

En el primer ensayo de microfiltración para jugo de melón, se observó que la densidad de los flujos del permeado expresados como LMH (litros por metro cuadrado por hora) presentaron una tendencia ascendente pero con bajos valores, en un rango de flujos de 30 a 58 LMH en 120 minutos; esto pudo ser debido a una baja permeabilidad de la membrana causada por un deficiente proceso de limpieza (Figura 4).

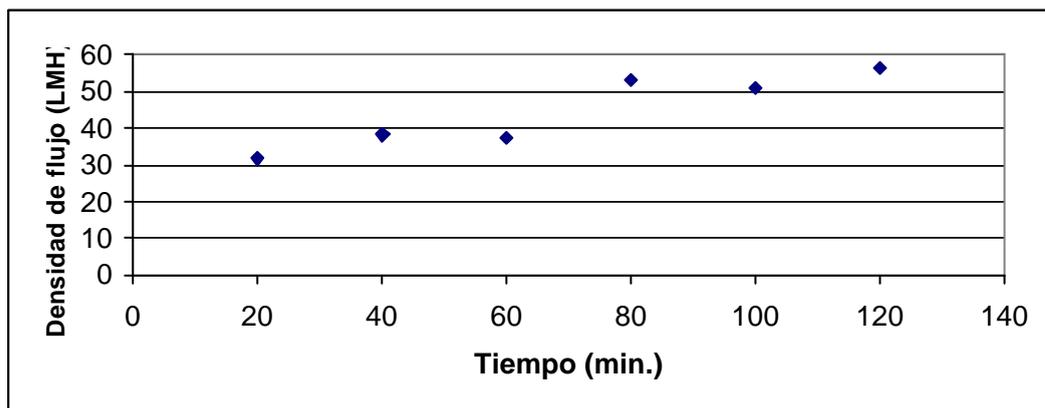


Figura 4. Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el primer ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de  $0.2\mu$

<sup>2</sup> Chaverri, M. 2003. Proyecto de Graduación. Elaboración de un jugo clarificado de melón por medio de MFT. CITA, Universidad de Costa Rica.

En el segundo ensayo se observaron densidades de flujos más altos en relación al primero obteniéndose un rango de 20 a 110 LMH en 120 minutos. La tendencia difirió mucho del primer ensayo ya que el flujo de permeado empieza a caer aceleradamente hasta el minuto 23, donde vuelve a ascender, para recaer hasta volverse mas o menos constante (Figura 5).

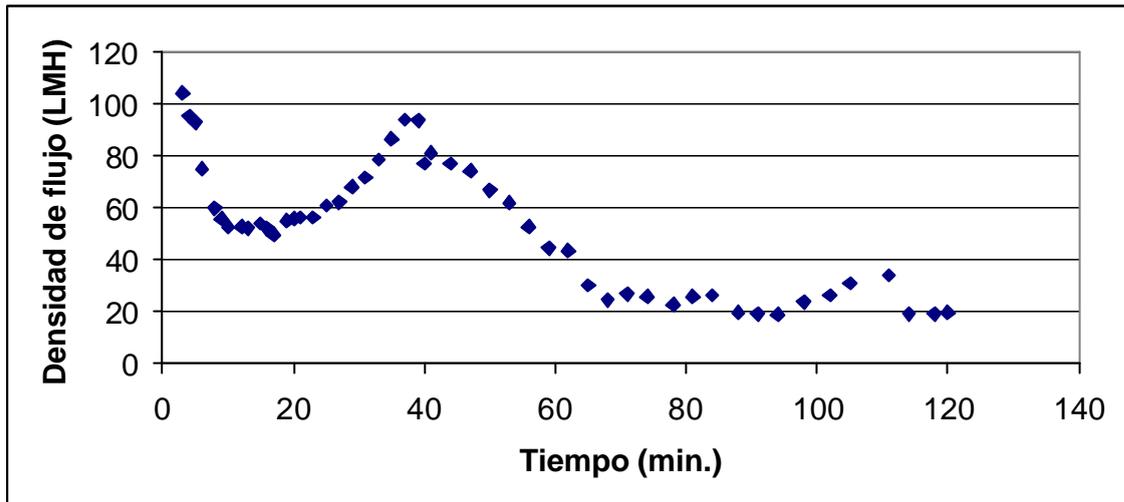


Figura 5. Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el segundo ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de  $0.2 \mu$

El aumento atípico observado, en el flujo de permeado, durante el proceso podría explicarse por la concentración en el retenido de sólidos que no fueron suficientemente hidrolizados en el transcurso del tratamiento enzimático, previo a la MFT. Estos sólidos insolubles generarían un barrido continuo de la capa de colmataje impidiendo que ésta aumente. Belleville *et al.* (1990) reportaron, durante la microfiltración de vino, que ciertos polisacáridos de gran tamaño formarían una capa protectora que prevendría el colmataje interno y permitiría mantener buenas condiciones de filtración. Dichos autores señalaron también que los polisacáridos de baja masa molar podrían provocar una disminución en el rendimiento y un colmataje interno irreversible. Este fenómeno probablemente predominaría durante la última fase de la MFT de jugo de melón, lo que explicaría la disminución del flujo de permeado observada al final del tratamiento.

#### 4.1.2 Jugo de mora

En los ensayos de microfiltración de mora, los resultados fueron muy diferentes debido a que la preparación del jugo de mora fue diferente. En el primer ensayo se utilizó un despulpador con malla No. 20, y en el segundo se utilizó malla tamaño 20 seguida de otra de 60 mesh. Esto resultó en tamaños de partículas grandes para el primer ensayo, lo que se vio reflejado en flujos de permeado muy bajos y colmatación muy rápida de la membrana.

En el primer ensayo se observaron flujos muy bajos en un rango de 3 a 8 LMH en 60 minutos. Lo anterior pudo ser causado por la composición del material a filtrar, ya que contuvo probablemente mucha cáscara, semillas y pectina (Figura 6).

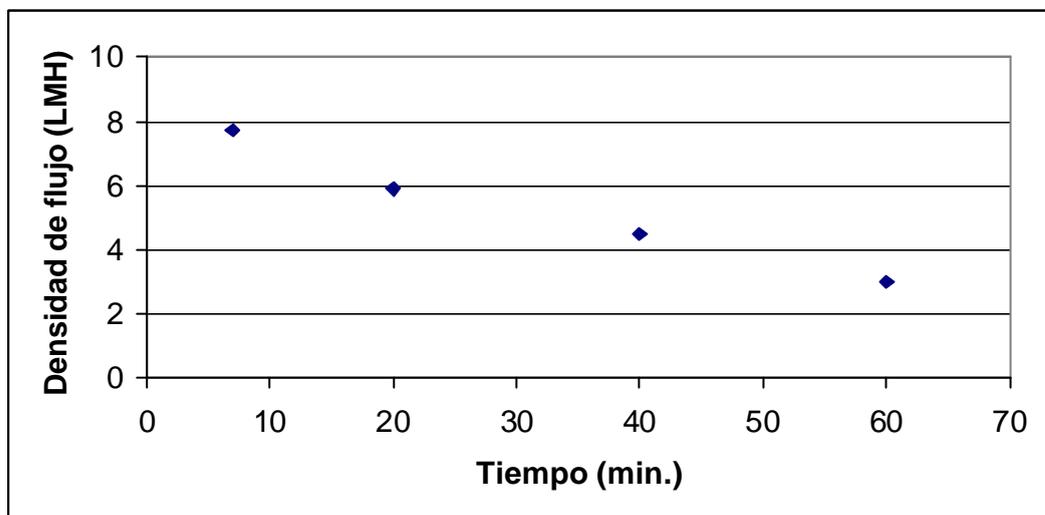


Figura 6. Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el primer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de  $0.2 \mu$

En el segundo ensayo, el uso de dos mallas en el despulpador aumentó considerablemente los flujos, observándose un rango de 40 a 68 LMH en 60 minutos. La reducción del tamaño de las partículas aumentó el área superficial y tal vez permitió que las pectinasas actuaran de forma más eficiente que en el primer ensayo (Figura 7).

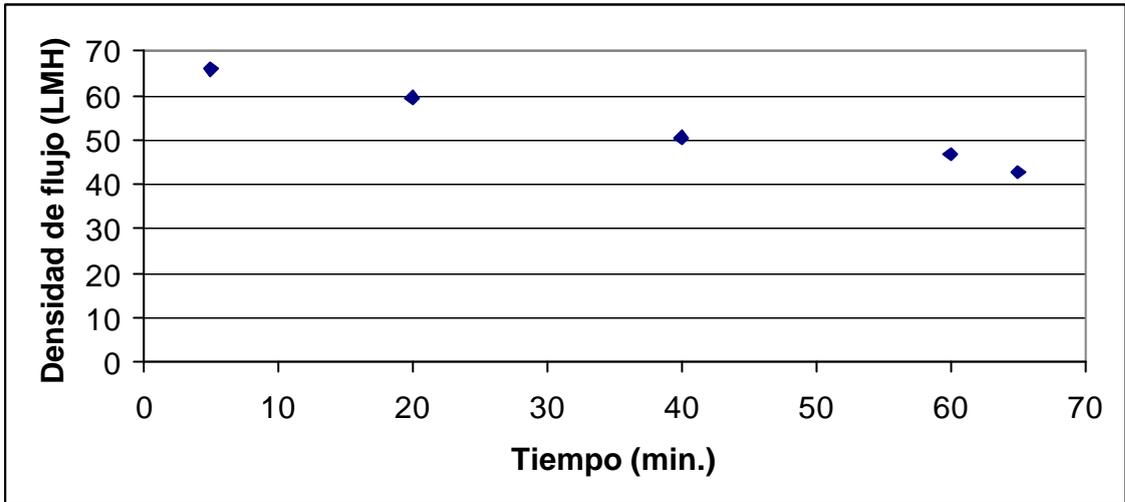


Figura 7. Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el segundo ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de  $0.2 \mu$

Adicionalmente se llevó a cabo un tercer ensayo con jugo de mora, usando esta vez membrana con tamaño de poro de  $0.5 \mu$ . El proceso fue el mismo que el aplicado en el segundo ensayo con membrana poro  $0.2 \mu$ ; se pudo observar que los flujos fueron mucho más altos, llegando a ser de 1147 LMH en los primeros minutos y bajando hasta 273 LMH al final. Esto probablemente debido a que hay un mayor rango de moléculas que atraviesan la membrana, lo cual reduce el tamaño y aumenta el tiempo de formación de la capa de colmataje. A continuación se muestra la gráfica de los flujos para el tercer ensayo de MFT de mora, con membrana de tamaño de poro  $0.5 \mu$  (Figura 8).

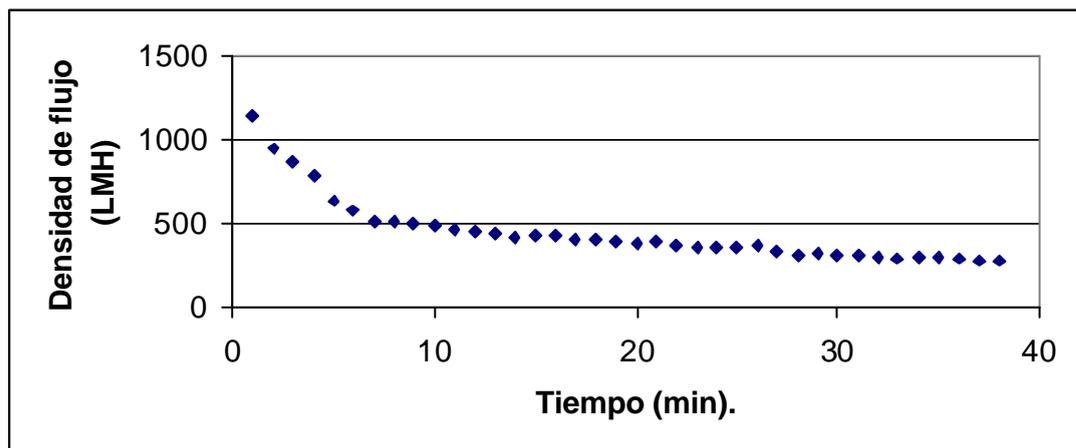


Figura 8 Densidad de los flujos del permeado (LMH) en el tercer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de  $0.5 \mu$

En los tres ensayos realizados la tendencia marcada fue la disminución gradual de la densidad de flujo del permeado, lo que se da a medida que la membrana se va colmatando y que se reduce el volumen de jugo de fruta en la marmita.

## 4.2 CONTENIDO DE CAROTENOIDES, ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES TOTALES EN EL JUGO CLARIFICADO Y EN EL RETENIDO

### 4.2.1 Jugo de melón

**4.2.1.1 Carotenoides.** En ambos ensayos, el contenido de carotenoides (expresado como  $\beta$ -caroteno) se concentró en el retenido (en el permeado fue cero); por ser este pigmento liposoluble no aparece en el permeado, ya que éste es la fracción acuosa, sino que permanece en la pulpa. La membrana deja pasar los solutos hidrosolubles. Normalmente retiene la fase lipídica aunque no puede impedir el paso marginal de microburbujas de fase lipídica, que tengan un tamaño menor al tamaño del poro. En el caso del melón, casi todos los carotenoides son retenidos siendo éstos un indicador del factor de reducción volumétrico (FRV).

En el primer ensayo, el contenido de carotenoides va en aumento en el retenido debido a la concentración del residuo, por efecto de la filtración de la fase acuosa (Figura 9).

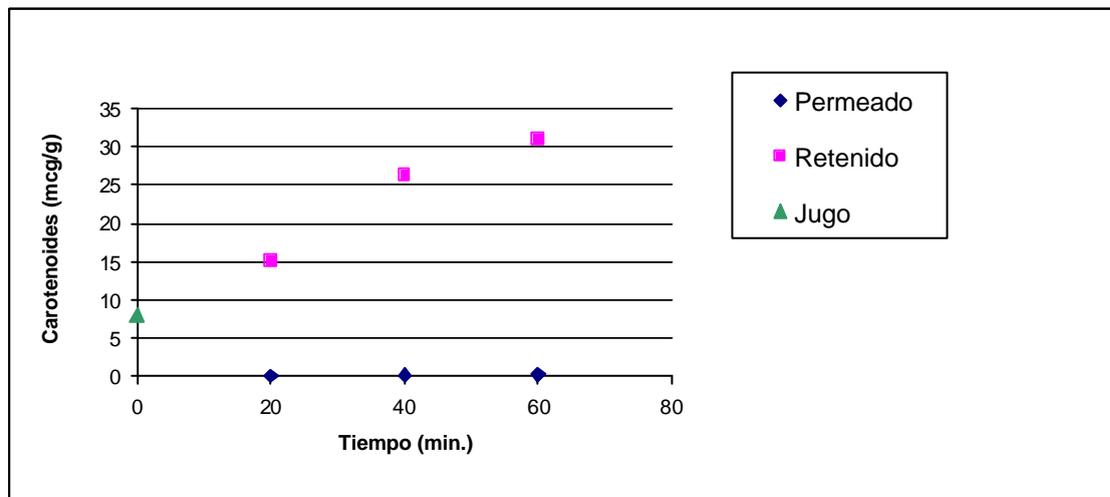


Figura 9. Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de carotenoides usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el primer ensayo

En el segundo ensayo nuevamente el permeado careció de carotenoides, los cuales se concentraron en el retenido. Los valores de estos pigmentos fueron menores que en el primer ensayo, a pesar de que en la segunda corrida los flujos de permeado fueron mayores, lo que implica que removió mayor volumen de jugo clarificado y el residuo al quedar más seco, debió tener mayor concentración de carotenoides. Sin embargo, lo

anterior podría deberse al uso de enzimas diferentes; en este segundo caso, se usó Tropical Cloud (celulasa y hemicelulasa) que podría haber causado una hidrólisis de

paredes celulares más efectiva que Rapidasa c-80, lo que se tradujo en un mayor rendimiento de jugo (Figura 10).

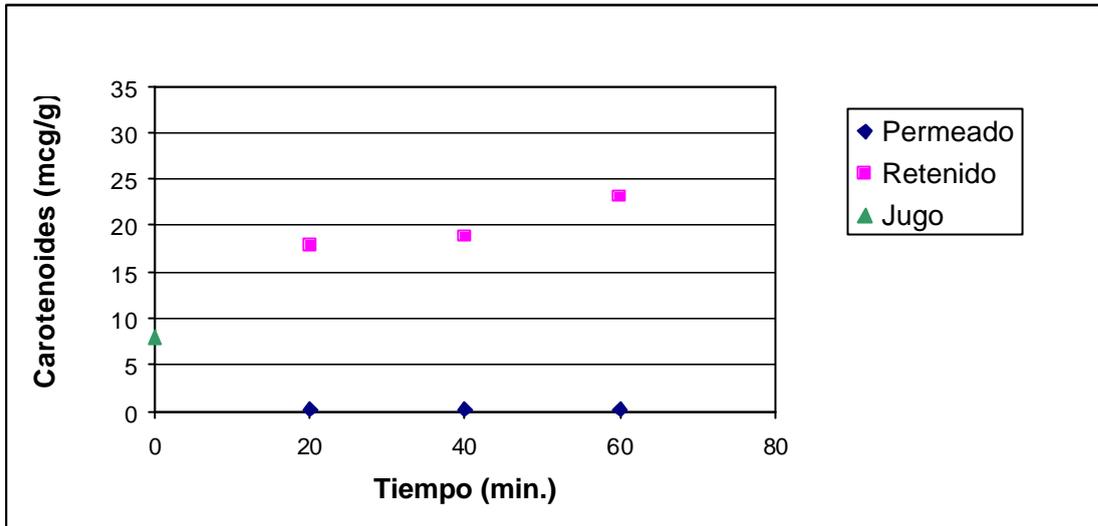


Figura 10. Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de carotenoides usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$ . en el segundo ensayo

**4.2.1.2 Polifenoles totales.** Los polifenoles totales en ambos ensayos permanecieron mayoritariamente en el retenido, aunque sus concentraciones variaron. En el primer ensayo (Figura 11) se encontró un rango de 1 – 4 mg/g en 60 minutos y en el segundo ensayo (Figura 12) fue de 3-5 mg/g en 60 minutos. En el permeado su concentración fue muy baja pero constante en ambos ensayos.

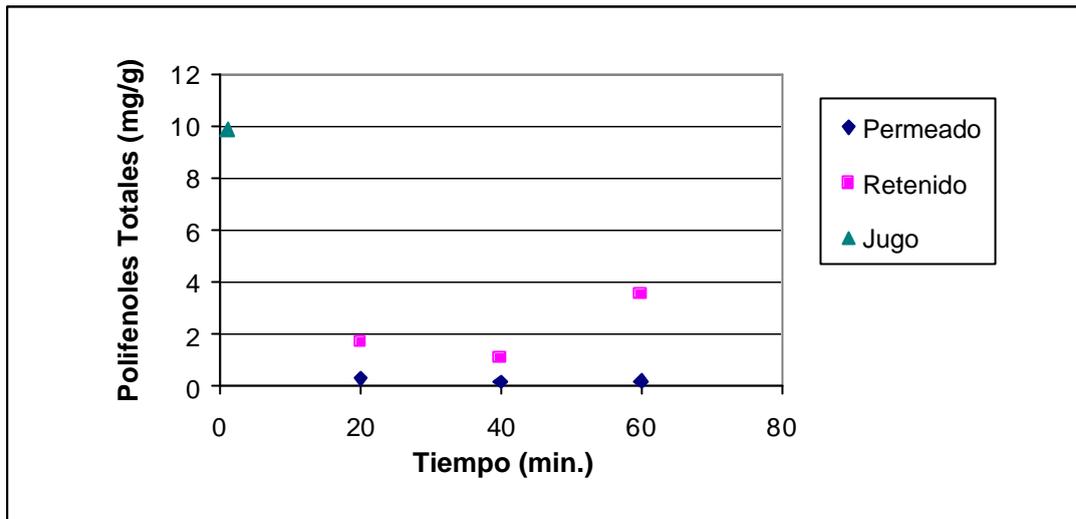


Figura 11. Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el primer ensayo

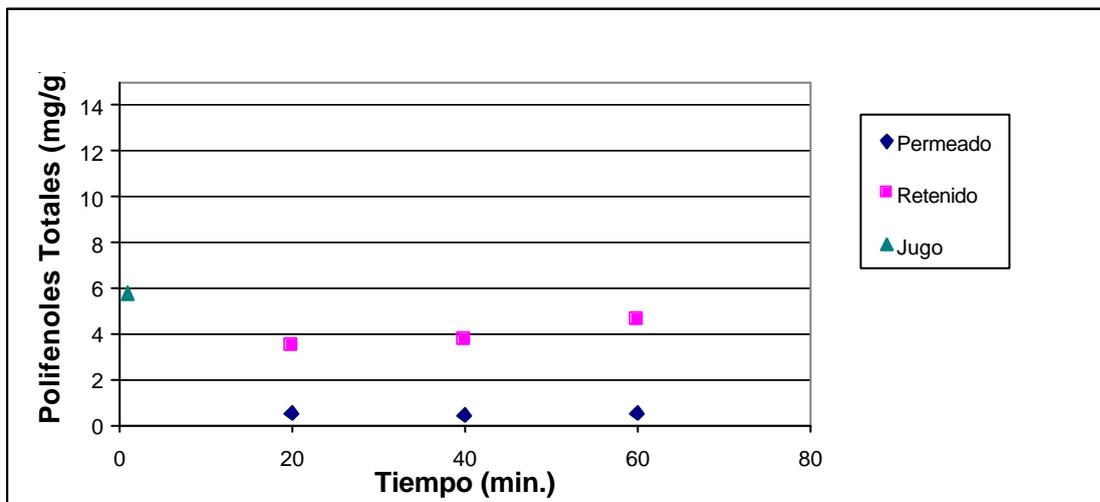


Figura 12. Efecto de la MFT del jugo de melón sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el segundo ensayo

## 4.2.2 Jugo de mora

**4.2.2.1 Antocianinas.** En ambos ensayos los contenidos de antocianinas fueron más altos en el permeado que en el retenido del jugo de mora, lo que indica que son altamente hidrosolubles. Las antocianinas podrían verse afectadas sólo si estuvieran atrapadas de cierta forma a las partículas del jugo; las enzimas usadas fueron celulasa y pectinasa, que debían actuar sobre estos componentes, liberando el contenido celular de los tejidos de la fruta.

En el primer ensayo se obtuvieron concentraciones en el permeado dentro del rango de 0.2 a 0.5 mg/L, mismas que fueron bajas ya que dependen de los flujos, los que decayeron por rápida colmatación de la membrana (Figura 13), restringiendo el paso de las antocianinas por los poros. Al usar malla 20, el jugo obtenido presentó partículas grandes, semillas y cáscaras que no tuvieron una hidrólisis enzimática efectiva, consecuentemente el contenido de antocianinas en el permeado fue bajo.

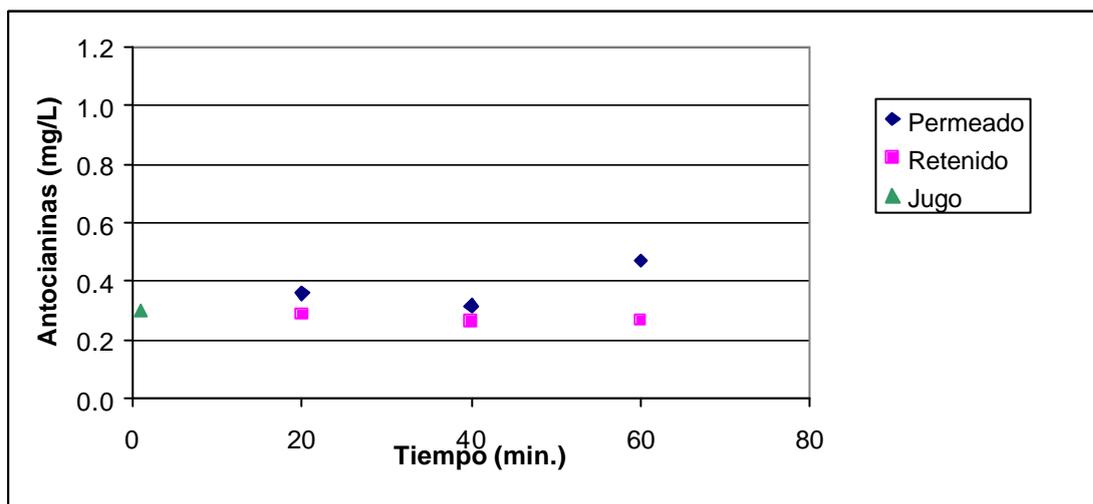


Figura 13. Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de antocianinas (mg/L) usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el primer ensayo

En el segundo ensayo se encontraron mayores concentraciones que en el primero, el rango de antocianinas en el permeado estuvo entre 0.7 y 1.0 mg/L y los valores en el retenido fueron muy parecidos a los del primer ensayo, fluctuando entre 0.2 y 0.4 mg/L. Las diferencias están dadas por los altos flujos del permeado y la baja formación de la capa de colmataje (Figura 14), que favorecieron el paso de las antocianinas hacia el filtrado. En este caso, el jugo de mora fue cernido dos veces (malla 20 y luego malla 60) resultando en un jugo menos viscoso, con partículas más pequeñas y por ello el tratamiento enzimático liberó más antocianinas del tejido, las que lograron pasar los poros y enriquecieron el permeado.

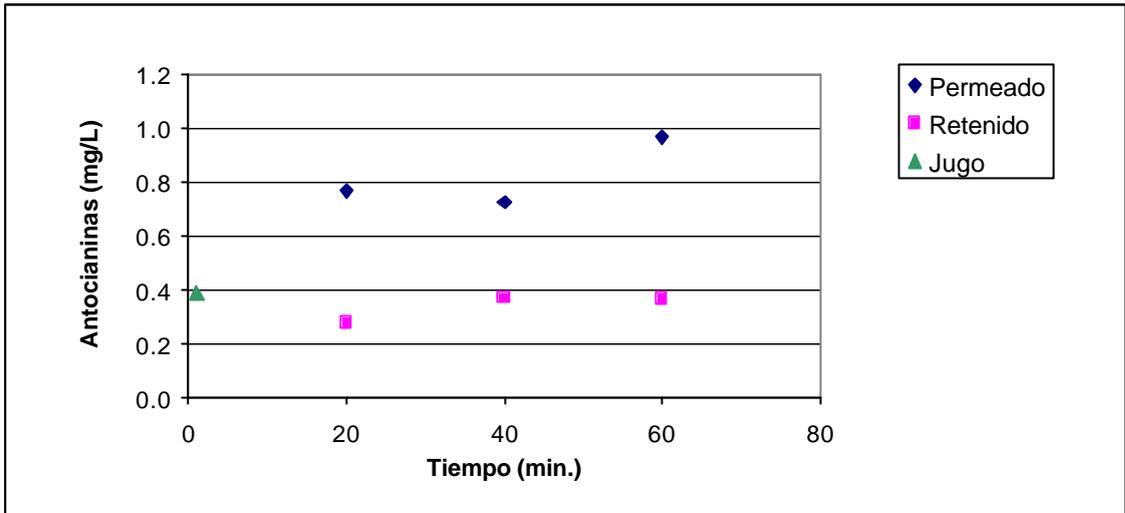


Figura 14. Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de antocianinas (mg/L) usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el segundo ensayo

El tercer ensayo se llevó a cabo utilizando membrana con tamaño de poro  $0.5\mu$ , donde la tendencia es parecida a los previos ensayos; los rangos de contenido de antocianinas en el permeado están entre 0.4 y 0.6 mg/L y en el retenido entre 0.2 y 0.4 mg/L. En comparación al segundo ensayo los contenidos son menores, debido a que el tamaño de poro facilitó el paso de un mayor flujo de permeado, el que resultó menos concentrado (Figura 15).

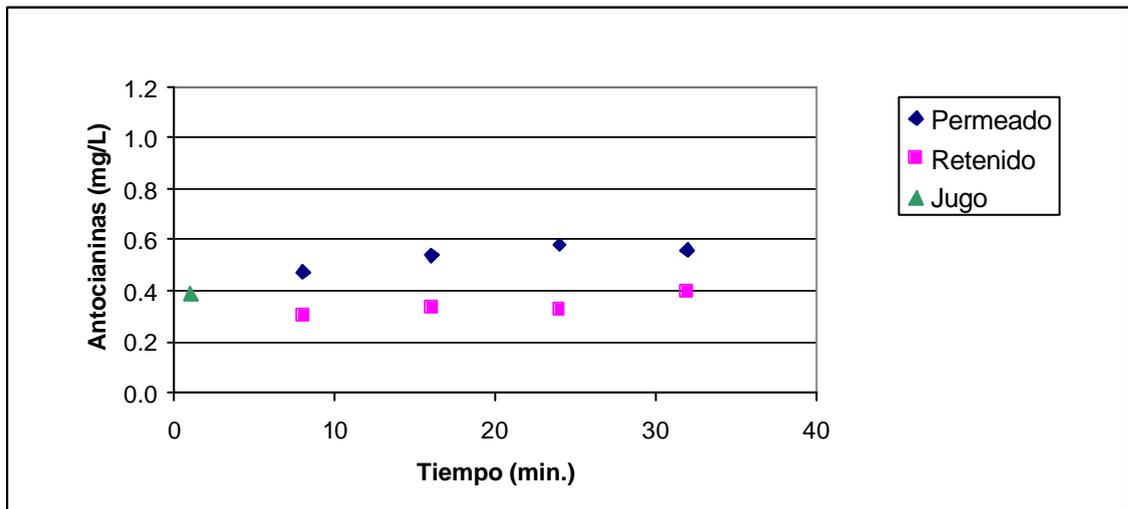


Figura 15. Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de antocianinas (mg/L) usando membrana con porosidad de  $0.5\mu$  en el tercer ensayo.

**4.2.2.2 Polifenoles totales.** El contenido de polifenoles totales en el jugo de mora mostró tendencias diferentes en los tres ensayos. Cabe resaltar que los tres se efectuaron bajo condiciones distintas, tales como uso de diferentes mallas del despulpador y tamaño de poro de la membranas ( $0.2\mu$  y  $0.5\mu$ ). En el primer y segundo ensayo, la mayoría de polifenoles queda en el retenido, posiblemente por el tamaño de las partículas versus el poro y la formación de la capa de colmataje. El rango de polifenoles totales en el permeado está alrededor de 2.5 a 4 mg/g y en el retenido de 2.5 a 3.8 mg/g aproximadamente (Figura 16).

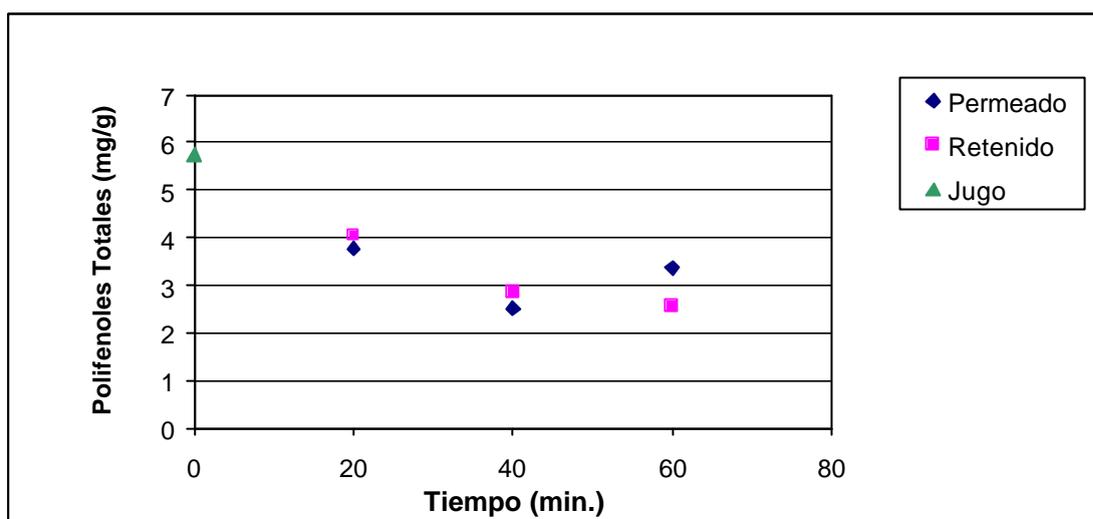


Figura 16. Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el primer ensayo

En el segundo ensayo se observó mayor diferencia en el contenido de polifenoles entre retenido y permeado. El rango de concentración en el permeado fue de 3 a 4 mg/g y en el retenido de 0.8 a 1 mg/g. (Figura 17).

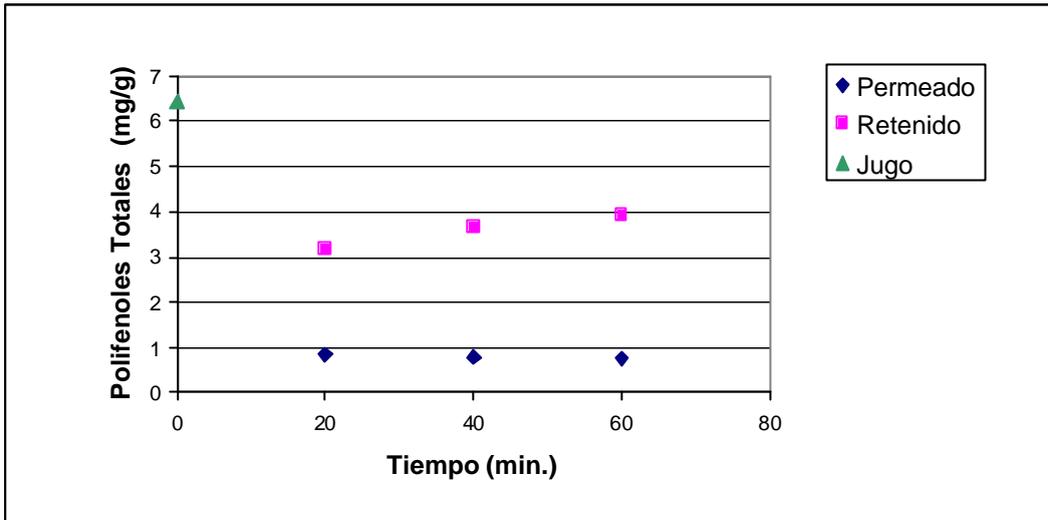


Figura 17. Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de  $0.2\mu$  en el segundo ensayo

En el tercer ensayo los polifenoles totales pasaron al permeado, debido al tamaño del poro, el rango de contenido en el permeado estuvo entre 1 y 1.4 mg/g y en el retenido entre 0.8 y 1.2 mg/g (Figura 18).

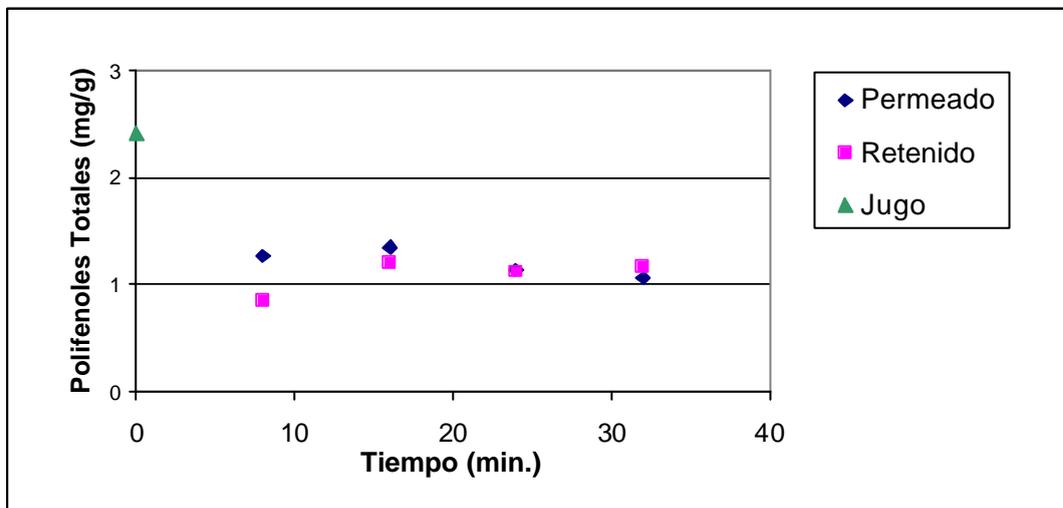


Figura 18. Efecto de la MFT del jugo de mora sobre el contenido de polifenoles totales (mg/g) usando membrana con porosidad de  $0.5\mu$  en el tercer ensayo

Cabe destacar que las tendencias en la distribución de los polifenoles entre el permeado y el retenido de los ensayos en mora, son muy similares a las que se observan en el contenido de antocianinas.

#### 4.3 CONTENIDO DE VITAMINA C EN EL JUGO DE FRUTA Y CLARIFICADO DE MELÓN Y DE MORA

La vitamina C en las muestras no se pudo determinar por ácido ascórbico, sino únicamente el ácido dehidroascórbico (DHA). En el melón, el DHA se concentra en el jugo clarificado por ser hidrosoluble (Cuadro 3); en cambio en mora el DHA se encuentra en concentraciones similares en el jugo clarificado y en el retenido (Cuadro 4).

Cuadro 3. Contenido de ácido dehidroascórbico (DHA) en jugo de melón, permeado y retenido

Descripción	Ácido Dehidroascórbico (DHA) (mg/100g)
Jugo de melón	7.4
Permeado @ 60 min con poro 0.2 $\mu$	15.8
Retenido @ 60 min con poro 0.2 $\mu$	5.2

Cuadro 4. Contenido de ácido dehidroascórbico (DHA) en jugo de mora, permeado y retenido

Descripción	Ácido Dehidroascórbico (DHA) (mg/100g)
Jugo de mora	16.6
Permeado @ 32 min con poro 0.5 $\mu$	15.4
Retenido @ 32 min con poro 0.5 $\mu$	17.0

Existieron muchas limitaciones en la cuantificación de vitamina C, una de ellas fue el prolongado tiempo que las muestras estuvieron congeladas sin ser analizadas, lo que produjo la oxidación del ácido ascórbico de las frutas y lo hizo “no cuantificable”, sólo midiéndose el DHA.

Otra de las limitantes fue la poca cantidad de muestra disponible. Con los valores señalados anteriormente no se pueden sacar conclusiones, se necesita realizar más ensayos con al menos tres réplicas y tomar una cantidad mayor de muestras.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EL JUGO DE FRUTA Y CLARIFICADO DE MELÓN Y DE MORA.

##### 4.4.1 Jugo de melón

En los ensayos llevados a cabo en melón, no hay datos que permitan emitir conclusiones claras ya que los valores de capacidad antioxidante fueron afectados por el tiempo que la muestra estuvo congelada, y porque las muestras no fueron almacenadas bajo algún medio que previniera la oxidación de los jugos. Para el primer ensayo los valores fueron cero en los permeados para los 0, 20 y 40 minutos, mostrando un ascenso en el minuto 60 en el extracto acuoso (Figura 19).

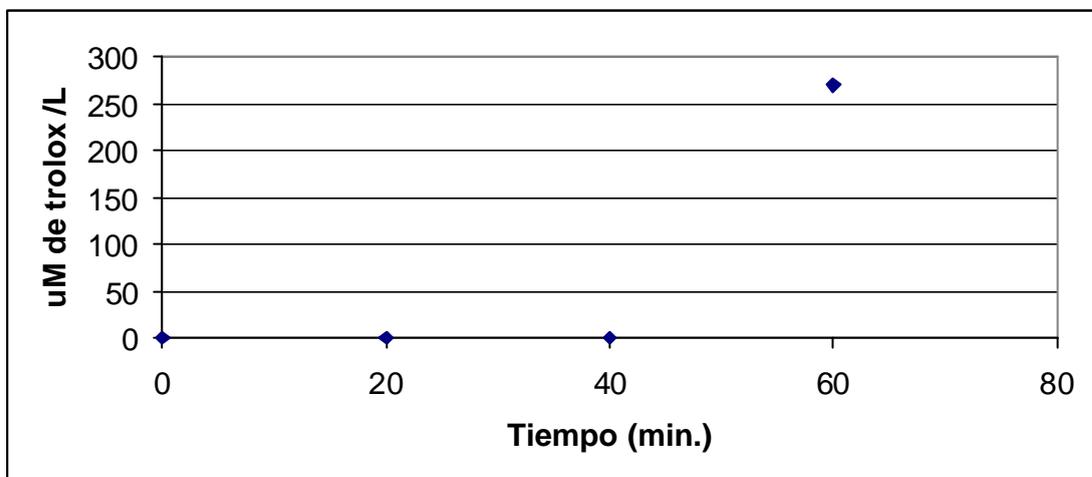


Figura 19. Capacidad antioxidante total expresada en  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox, para el primer ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de  $0.2\mu$

En el segundo ensayo, se observaron valores altos en comparación al primer ensayo, a los 20 y 40 minutos, ascendiendo desde el minuto 0 hasta el 40 y decayendo en el 60, en donde se obtuvo un valor cero en los valores del permeado (Figura 20).

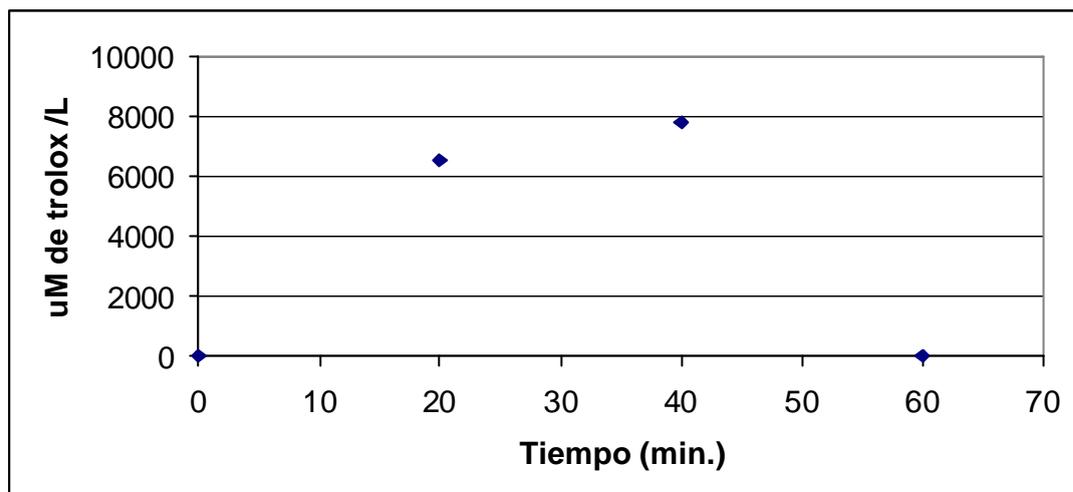


Figura 20. Capacidad antioxidante total expresada en  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox, para el segundo ensayo de MFT de melón, membrana con porosidad de  $0.2\mu$

Los valores son mayores para el segundo ensayo, por lo que en las microfiltraciones de melón llevadas a cabo no se puede observar una tendencia.

#### 4.4.2 Jugo de mora

En los ensayos de mora el rango de valores de capacidad antioxidante estuvieron entre 6000 y 15000  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox para los jugos permeados. En general se observa una tendencia a mantener la capacidad antioxidante, es decir el jugo inicial cuenta con valores similares a los jugos clarificados. (Figuras 21 y 22).

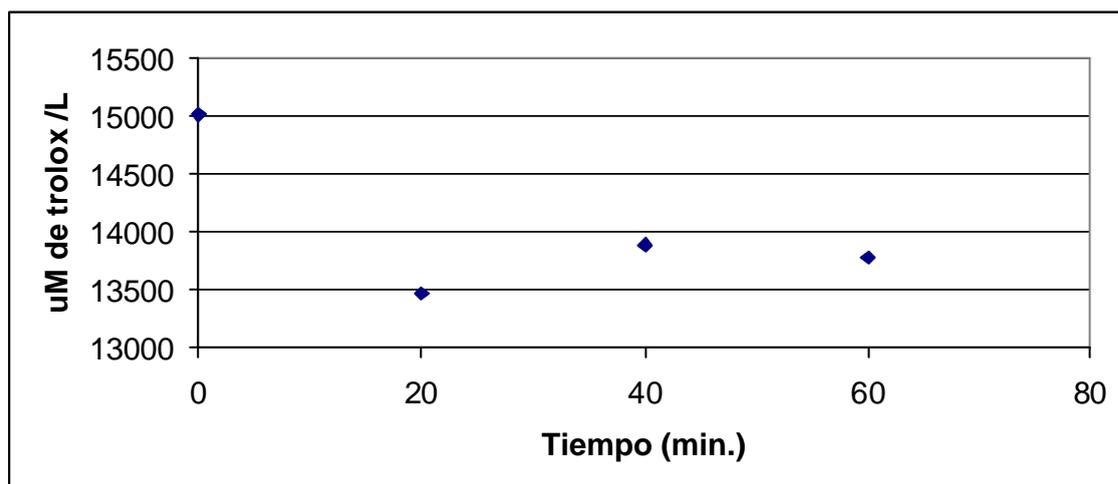


Figura 21. Capacidad antioxidante total expresada en  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox, para el primer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de  $0.2\mu$

Tanto en el primero como en el segundo ensayo, el ORAC del jugo fresco mostró valores muy cercanos (15007.044 y 11555.77 en  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox, respectivamente). El segundo ensayo muestra una tendencia más uniforme que el primero, que sufre una caída en los 20 y 60 minutos.

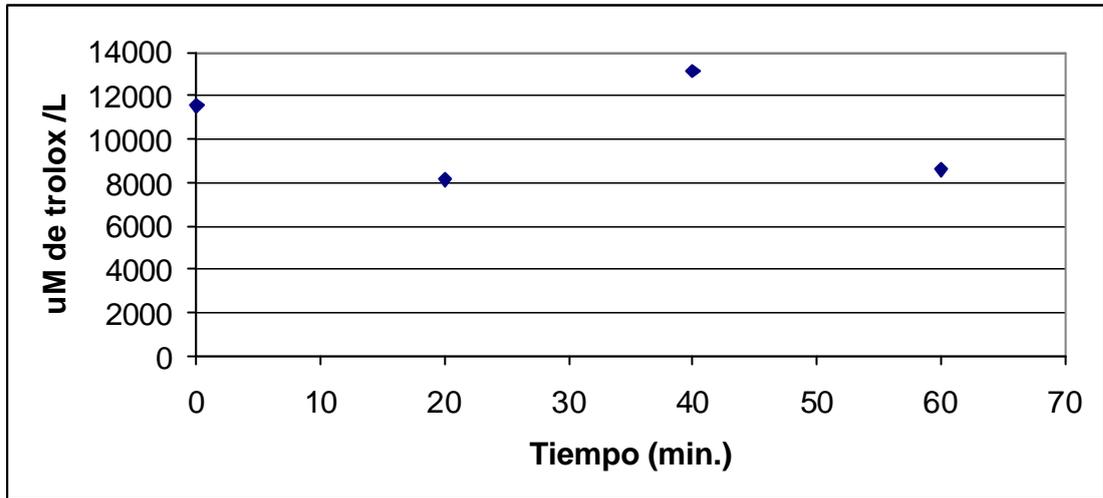


Figura 22. Capacidad antioxidante total expresada en  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox, para el segundo ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de  $0.2\mu$

En el tercer ensayo de microfiltración de mora con membrana  $0.5\mu$  la capacidad antioxidante muestra una tendencia uniforme con un rango de 9000 a 14000  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox con una tendencia a incrementarse a los minutos 24 y 32 (Figura 23).

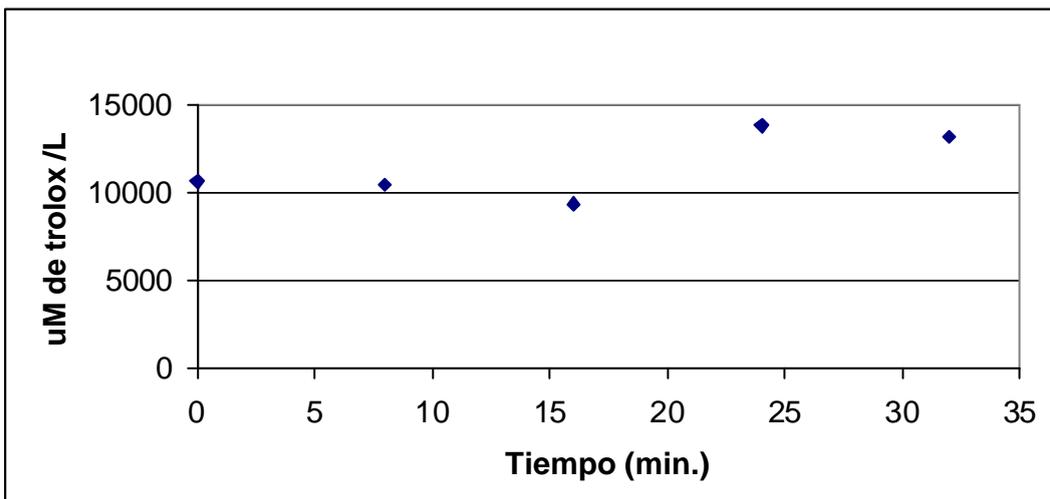


Figura 23. Capacidad antioxidante total expresada en  $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$  de trolox, para el tercer ensayo de MFT de mora, membrana con porosidad de  $0.5\mu$

## 5. CONCLUSIONES

- En la microfiltración del jugo de melón, la densidad de flujo del permeado fue irregular, reflejando ciclos de colmatación de la membrana seguida por efectos del barrido de las partículas del retenido.
- En la microfiltración del jugo de mora, la densidad de flujo de permeado fue disminuyendo paulatinamente con respecto al tiempo, debido a colmatación de la membrana.
- Para el jugo de melón, los carotenoides y los polifenoles totales tendieron a quedarse en el retenido.
- Para el jugo de mora, las antocianinas tendieron a quedarse en el permeado; mientras que los polifenoles totales se distribuyeron igualmente en ambas fracciones.
- La vitamina C se oxidó totalmente a ácido dehidroascórbico, concentrándose más en el permeado del jugo de melón, mientras que se distribuyó igualmente en el permeado y el retenido del jugo de mora.
- En cuanto a la capacidad antioxidante de los jugos no se puede establecer conclusiones debido al lapso de tiempo transcurrido hasta el análisis.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Optimizar el tratamiento enzimático para la microfiltración de jugo de mora, previo al establecimiento del parámetro de presión transmembranaria, que resulte en densidad de flujo óptimo.
- Mejorar el protocolo de lavado de la membrana y asegurarse que se inicia con el mismo flujo de permeado.
- Analizar las muestras a la brevedad posible para evitar daños por oxidación; o caso contrario, mantenerlas en congelación y protegidas de la luz.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini, A.E.; Abuja, J.A. 1999. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Res.* 1999 Mar;30(3):181-8. Consultado el 1 de septiembre de 2003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Belleville, M.P.; Brioullet J.M.; Tarodo De La Fuente, B.; Moutounet, M. 1990. Polysaccharide effects on cross-flow filtration of two red wines with a microporous alumina membrane. *Journal of Food Science.* 55: 1598-1605
- Cao, G.; Prior, R.; Wang, H. 1996. Total antioxidant capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44(3): 701-705.
- CNP (Centro nacional de producción). 1997. Programa de Certificación y Control de la Calidad. CNP. San José, Costa Rica. 76-82.
- Colciencias, 2001. Nueva tecnología para extracción de pulpas. Consultado el 18 de febrero de 2003 Disponible en: [www.colciencias.gov.co/agenda/pn30.html](http://www.colciencias.gov.co/agenda/pn30.html)
- Corporación Colombia Internacional, 2001. Precios de melón a nivel mundial. No. 31. Consultado el 12 de febrero de 2003. Disponible en: [www.cci.org.co/publicaciones/Precios%20internacionales/PRECIOS%2031.pdf](http://www.cci.org.co/publicaciones/Precios%20internacionales/PRECIOS%2031.pdf)
- Dziezak, J. 1990. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. *Food Technology.* September edition, 108-113.
- Facultad de Agronomía-México. 2002. Cultivo de mora. Consultado el 18 de febrero de 2003. Disponible en: <http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/mora.htm>
- INCAP (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá), 1996. Valor nutritivo de los alimentos de Centroamérica. Guatemala. 98 p.
- Jones, C. 2000. Foods and Phytochemicals in cancer prevention and treatment. An independent CME study for healthcare providers. *ARC Mesa Educators.* 14-15
- Lozano, J. 1999. Tecnología de membranas de ultra y nanofiltración aplicada al procesamiento de frutas. Plapiqui (UNS-CONICET). Bahía Blanca, Argentina.

Macarrone, E., Fanella, F.; Rapisarda, P. 2000. Reliability of analytical methods of determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2249-2252.

Ministerio de Agricultura Colombiano, 2003. Exploración de mercados de frutas tropicales frescas. Consultado el 1 de septiembre de 2003. Disponible en: [http://www.agrocadenas.gov.co/inteligencia/int\\_frutales.htm](http://www.agrocadenas.gov.co/inteligencia/int_frutales.htm).

Paulson, D.J.; Wilson, R.L.; Spatz, D.D. 1984. Crossflow membrane Technology and its applications. *Food Technology*. 38: 77-111.

Pepper, D. 1987. From cloudy to clear. Food, Flavonoids, Ingredient, Processing and Packaging. *Journal of Agricultural and Food Science*. 9(10): 65.

Phillip, T.; Chen, T-S. 1988. Development of a method for the quantitative estimation of Provitamin A carotenoids in some fruits. *Journal of Food Science*. 53: 1703-1706.

Proyecto ciencia, vino y salud, 2003. Mecanismos de Protección de los antioxidantes. Volumen 6 No.1. 2002. Pontificia Universidad de Chile. Consultado el 31 de agosto 2003. Disponible en: <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/61mecan2.htm>.

Salas, R. 2003. Estudio del proceso de clarificación de jugo de banano mediante microfiltración tangencial. Proyecto final de graduación. Licenciatura en Tecnología de alimentos. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Singleton, V.; Slinkard, K. 1977. Total phenol analysis comparison with manual methods. *Journal of Agricultural and Food Science*. 28(1):50-55.

Vaillant, F. 2000. Clarification et concentration de jus de fruits tropicaux pulpeux associant traitements enzymatiques, microfiltration tangentielle et évaporation osmotique. Thèse de Doctorat. Spécialité génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Montpellier.

Vasconcellos, A. 2001. Revista: La alimentación latinoamericana. Los alimentos del futuro. *Publitec*, Chile. 239:10-22.

## **8. ANEXOS**

**ANEXO 1.****Ciclo de lavado de la membrana del microfiltrador.**

<b>CICLO DE LAVADO DE LA MEMBRANA</b>	
<b>ETAPA 1</b>	
Agente limpiador	Agua
Temperatura	50°C
Duración	30 min.
CICLOS	
10 min:	P <sub>tm</sub> = 0, U= 0
20 min:	P <sub>tm</sub> = 100-200 kPa, U= 5 m/s
<b>ETAPA 2</b>	
Agente limpiador	agua y Ultrasil 25 (NaOH) al 2%
Temperatura	50°C
Duración	40 min.
CICLOS	
20 min:	P <sub>tm</sub> = 0, U= 5
20 min:	P <sub>tm</sub> = 100-200 kPa, U= 5 m/s
<b>ETAPA 3</b>	
Agente limpiador	Agua
Temperatura	50°C
Duración	30 min.
CICLOS	
10 min:	P <sub>tm</sub> = 0, U= 0
20 min:	P <sub>tm</sub> = 100-200 kPa, U= 5 m/s
<b>ETAPA 4</b>	
Agente limpiador	agua y Ultrasil 10 al 1%
Temperatura	80 °C
Duración	30 min.
CICLOS	
30 min:	P <sub>tm</sub> = 100-200 kPa, U= 5 m/s
<b>ETAPA 5</b>	
Agente limpiador	Agua
Temperatura	50°C
Duración	50 min.
CICLOS	
10 min:	P <sub>tm</sub> = 0, U= 0
20 min:	P <sub>tm</sub> = 100-200 kPa, U= 5 m/s

<p>P<sub>tm</sub> :Presión transmembranaria  P<sub>tm</sub> 0 (Modo de recirculación)  U: velocidad m/s</p>
---

Fuente: Vaillant, 2000

**ANEXO 2.**

**Determinación de antocianinas:** método 3 según Maccaronne *et al.* (2000).

**CURVA ESTÁNDAR**

Se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de antocianinas de mora. Extracción de antocianinas. La fruta se pasó por un procesador de alimentos y luego se centrifugó. Se tomó una alícuota de 10 L del jugo y se filtró a través de una jeringa Sep pack C18 de 5 mL. Se lavó con agua destilada y se recuperó el pigmento lavándolo con metanol-HCl al 0.1%. Esta solución se evaporó a 35°C al vacío y se redisolvió con etanol-HCl (80:20) hasta llevar a volumen conocido.

Cuantificación. 25 mL de jugo fueron diluidos a 100 mL utilizando una mezcla 80/20 de 95% de etanol y 37% de HCl. La absorbancia fue medida a 535nm y la concentración (C) de antocianinas se calculó por la siguiente ecuación:

$$C_{\text{mg/L}} = (\text{Net Abs}_{530} / \text{pendiente de curva estándar}) \times \text{FD}$$

Donde  $\text{Net Abs}_{530}$  está dado por  $\text{Abs}_{530} - (\text{Abs}_{420} + \text{Abs}_{620})/2$ .

FD: Factor de dilución

### ANEXO 3.

**Determinación de carotenoides.** El método utilizado fue el colorimétrico según Phillip y Chen, (1988) pero se utilizaron proporciones diferentes en el ensayo.

#### **Extracción:**

Se analizó la pulpa de la fruta por duplicado, haciéndola puré en una batidora. La fruta fue pesada entre un rango de 1.5 a 2.5g (conteniendo aproximadamente 0.05-0.10 mg de carotenoides), luego homogenizada con 15 mL de metanol y 0.25g de MgCO<sub>3</sub> por 1 minuto a altas velocidades y filtradas a través de un embudo Buchner, con filtro Whatman No. 40. Se agregó posteriormente una mezcla de acetona-éter de petróleo(20:80), en el embudo buchner.

El concentrado filtrado (75mL) se transfirió a un embudo de separación y se lavaron con 62.5mL de agua destilada; y una segunda vez con 25mL, la fase acuosa se drena y la capa de éter de petróleo debe ser secada sobre el sulfato de sodio anhidro. La capa de éter de petróleo se diluye y se llevó a 50 mL o 10mL para las medidas espectrofotométricas.

Los carotenoides totales se determinan por espectrofotometría basada en los coeficientes de extinción ( $E_{1\%}$ ) para los carotenoides en éter de petróleo; *beta*-caroteno 2250 a 449 nm (melón, banano, mango, piña), luteoxantina 2250 a 425 nm (piña), vale recalcar que las concentraciones calculadas por este método fueron aproximadas.

#### ANEXO 4.

**Determinación de la capacidad antioxidante:** método O.R.A.C. (Oxygen radical absorbance capacity) (Cao *et al.*, 1996).

#### Reactivos necesarios

Preparación de las soluciones

- **Tampón de fosfatos 75 mM de pH 7.4**

Se deben preparar las siguientes soluciones de fosfatos:

A : 0.2 M fosfato de sodio monobásico. Pesar 27.8 gramos en 1000mL de agua destilada.

B : 0.2 M fosfato de sodio dibásico. Pesar 53.65 gramos en 1000mL de agua destilada.

Posteriormente:

Mezclar 71 mL de A (mono) con 304 mL de B (di) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

Preparar 1500 ml de tampón en total.

- **Solución de Fluoresceína  $8,16 \times 10^{-5}$  mM en tampón de fosfato pH 7.4.**

Solución Madre: Pesar 0,200 g de fluoresceína (PM 376.3 g/mol) y diluir en 1 litro de tampón. Se envasa en botella oscura y se conserva a 4°C hasta por dos meses.

Solución de trabajo: Tomar 7.68  $\mu$ L (medirlos con micropipeta de 20  $\mu$ L) de la solución madre y se afora a 50 mL con tampón, para obtener una concentración de  $8.16 \times 10^{-5}$  mM.

- **Solución de Trolox de concentración de 40 mM en tampón de fosfato pH 7.4.**

Solución Madre: Pesar 0,200 g de Trolox (PM 250,32 g/mol) y diluir en 100 ml de tampón. Se envasa en botella oscura y se conserva en un baño con hielo (4°C).

Solución de trabajo: Tomar 250  $\mu$ L de la solución madre y se afora a 50 mL con tampón.

- **Solución de AAPH (Radical Libre) de 153 mM en tampón de fosfato pH 7.4.**

Se pesan 0.4149 gramos de AAPH (PM 271,17 g/mol) y se disuelve completamente en un balón aforado con 10 mL de tampón y se conserva en un baño con hielo (4°C).

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

### Extracto acuoso

1. Sí se trata de una fruta o vegetal entero, retirar la cubierta externa y desemillar en caso de que sea necesario.
2. Tomar una masa medida de muestra y homogenizarla junto con una masa medida de agua, buscando que haya una relación exacta entre el agua y la masa de la muestra (Ej. 1:1, 1:2).
3. Colocar en dos tubos de centrífuga una masa medida de muestra homogenizada y centrifugar durante 10 minutos a 2000-3500 rpm. Determinar el volumen total de muestra.
4. Posteriormente a la centrifugación, tomar los datos referentes a la masa y el volumen del sobrenadante y de la masa y el volumen del residuo del centrifugado.
5. El líquido sobrenadante corresponde al extracto acuoso que constituye el “jugo” de la muestra. Almacenar en congelación.

### Extracto acetónico

1. Al residuo de la centrifugación se le determina la masa y el volumen, y se le adiciona un volumen de acetona 1:7 con relación al volumen medido. La acetona se debe preparar en una proporción 1:1 con agua destilada.
2. Poner en agitación el residuo de la centrifugación y la acetona durante 30 minutos.
3. Al cabo de los 30 minutos, centrifugar durante 10 minutos a 2000-3500 rpm.
4. Posteriormente a la centrifugación, tomar los datos referentes a la masa y el volumen del sobrenadante y de la masa y volumen del residuo del centrifugado.
5. El líquido sobrenadante corresponde al extracto acetónico, lo que constituye la “pulpa” de la muestra. Almacenar en congelación.

## MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

### Acondicionamiento del equipo de Espectrofluorofotometría.

1. Conectar y prender el regulador de voltaje.
2. Conectar y prender el espectrofluorofotometro en el botón frontal abajo del panel.
3. En la pantalla se despliegan una serie de íconos y todos deben estar OK.
4. Posteriormente aparece un menú de inicio. En ese momento se procede a prender la lámpara de Xenón, cuyo interruptor se encuentra en el costado derecho del equipo.
5. Nuevamente se despliegan los íconos y posteriormente el menú de inicio.
6. Se debe seleccionar el modo 2 Cuantitativo del menú de inicio.
7. Posteriormente se deben ajustar las condiciones de trabajo del equipo. Se debe seleccionar 2 Longitud de onda de excitación y ajustar a 493 nm. Luego se selecciona 3 Longitud de onda de emisión y ajustar a 515 nm. Por último, se debe seleccionar 5 N° de repeticiones e indicar 3 repeticiones.

8. Al finalizar de ajustar las condiciones, seleccionar de las funciones del pie de pantalla la que indica Samplemeas.
9. El equipo está listo para realizar la medición de la fluorescencia. Antes de realizar la primera medición se debe oprimir Auto/Zero. Para realizar la medición se debe oprimir Start/Stop. Para eliminar los datos innecesarios se debe oprimir Clear.
10. Cuando se finalizan las mediciones y se debe apagar el equipo, se oprime Return dos veces hasta llegar al menú de inicio. Se procede a apagar primero la lámpara de Xenón en el interruptor ubicado en el costado derecho del equipo. Se espera unos 5-10 minutos con el fin de que el equipo enfríe la lámpara antes de apagarlo.
11. Por último se apaga el equipo en el botón frontal, se apaga la regleta y se apaga y se desconecta el regulador de voltaje.

### **Medición de la fluorescencia**

1. Para la medición del poder antioxidante de las muestras, se deben preparar diluciones de los extractos (acuoso o acetónico), con el objetivo de que el poder antioxidante decaiga en un lapso de 45 minutos a un 10% del valor inicial medido. Para ello se toman 100 $\mu$ L del extracto y se diluye en un volumen conocido de agua destilada, el cual puede oscilar entre 10mL a 500mL o 1L inclusive, dependiendo del tipo de muestra por analizar.
2. En un tubo de ensayo, colocar 250 $\mu$ L de la dilución del extracto acuoso (jugo) o del extracto acetónico (pulpa) que se obtuvo de la muestra. En el caso de realizar la medición de un blanco se debe adicionar, en su lugar, 250 $\mu$ L de la solución tampón de fosfatos y si se desea realizar una medición del patrón se deben adicionar entonces 250 $\mu$ L de solución de trolox.
3. Luego se añaden 1.5 ml de la solución de Fluoresceína y se coloca el tubo en un baño maría por 15 minutos a 37°C.
4. Al cabo de este periodo se realiza la primer medición, al tiempo 0, colocando la mezcla anterior en la cubeta de espectrofluorofotometría y ubicándola en el equipo. La cubeta posee una marca (6) para que ésta sea colocada siempre en la posición.
5. Después de esta medición, se procede a añadir 250 $\mu$ L de la solución de AAPH (radical libre) y se empieza a tomar el tiempo a partir de este momento. Se debe realizar la medición por triplicado cada minuto. Cuando se alcanzan los 45 minutos se debe tener un 10% del valor medido al tiempo 0, si esto no ocurre se debe trabajar con las diluciones, ya sea para concentrar o para diluir la muestra.

Por último se deben anotar todos los datos en la hoja de resultados e introducirlos en la hoja de cálculo para obtener el resultado.

**ANEXO 5.****Determinación de Fenoles Totales:** (Singleton y Slinkard, 1977)

Procedimiento 1.

Preparación de Curva Patrón.

Solución madre: 40mg de ácido gálico/100mL de agua destilada

No. Tubo	Concentración (mg/L)	Solución madre (mL)	Agua destilada (mL)
0	0	0.00	2.00
1	20	0.05	1.95
2	40	0.10	1.90
3	60	0.15	1.85
4	80	0.20	1.80
5	100	0.25	1.75
6	120	0.30	1.70
7	140	0.35	1.65
8	160	0.40	1.60

*Tiempo de reacción: 2 horas.*

$$Y = 0.0053x + 0.0337$$

$$R^2 = 0.9971$$

Nota: en caso de que el ácido gálico no se disuelva, se puede utilizar 5 mL de etanol al 95%.

Procedimiento 2.

- 0.25 mL de muestra o patrón
- 1.25 mL de Folin- Ciocalteu
- 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 75g/L

Hacer un blanco, y el volumen final es de 2.5 mL, leer a una longitud de onda de 465 nm.