Efecto de aplicación de voltaje sobre la carga microbiana y el contenido de vitamina C en jugo de maracuyá (*Passiflora edulis*).

Washington Armando Orellana Díaz

Honduras
Diciembre, 2006

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Efecto de aplicación de voltaje sobre la carga microbiana y el contenido de vitamina C en jugo de maracuyá (*Passiflora edulis*).

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al titulo de Ingeniero en Agroindustria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Washington Armando Orellana Díaz

Honduras
Diciembre, 2006

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.

Washington Armando Orellana Díaz

Honduras
Diciembre, 2006

Efecto de aplicación de voltaje sobre la carga microbiana y el contenido de vitamina C en jugo de maracuyá (*Passiflora edulis*).

Presentado por:

Washington Armando Orellana D.

Aprobado:

_____	_____
Francisco Javier Bueso, Ph. D. Asesor Principal	Raúl Espinal, Ph. D. Director Carrera de Agroindustria
_____	_____
Wilfredo Domínguez, M. Sc. Asesor	George Pilz, Ph.D. Decano académico.
	_____
	Kenneth L. Hoadley, D.B.A. Rector.

DEDICATORIA

A Dios, mis padres y mis abuelos por su apoyo incondicional durante los estudios de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A Saraí Alvarado, por todo su cariño, apoyo y comprensión durante mi último año de carrera

Al Dr. Francisco Bueso y al ingeniero Wilfredo Domínguez por toda su accesoria técnica en este proyecto.

Al ingeniero Víctor Taleón, por toda su colaboración ténica y emocional.

A mis amigos que siempre han estado a mi lado, David Pazmiño, Damir Torrico, David Córdova, Leonel Sorto, José Araya , Luis Lemus, y Cristina Jácome.

RESUMEN

Orellana, W. 2006. Efecto de aplicación de voltaje sobre la carga microbiana y el contenido de vitamina C en el jugo de maracuyá (*Passiflora edulis*).25 p.

El maracuyá se comercializa principalmente como jugo listo para beber, el cual debe pasar por un proceso de pasteurización cumpliendo normas legales. La pasteurización es un proceso que usa temperatura de 72°C por 15 segundos y asegura reducciones de la carga microbiológica, pero degrada compuestos termosensibles de gran valor nutricional como la vitamina C. El objetivo de este estudio fue evaluar cambios en contenido de vitamina C, color y carga microbiana usando un diseño experimental de bloques completos al azar, con tratamientos de 72°C, 50°C más 120 V, 28 °C mas 120 V, los cuales fueron comparados con un control. Se desarrolló y validó un método de detección de vitamina C por medio de cromatografía líquida de alta precisión comparándolo con el método oficial de la AOAC 967.21 para detectar niveles en las muestras de los tratamientos. En el programa estadístico SAS® se realizó una prueba T en donde no se encontraron diferencias entre usar el método HPLC y 2,6 dicloroindofenol lo que indica igual exactitud entre ambos métodos, y mayor precisión por parte del HPLC por presentar 4 decimales y menor coeficiente de variación. Se realizó un análisis de varianza, encontrando diferencias significativas ($P<0.05$) en la carga microbiológica, contenido de vitamina C y valores de color L*a*b* de todos los tramientos comparados con el control. El tratamiento que presentó mayor reducción de microorganismos y menor pérdida de vitamina C, fue la aplicación de 120 voltios de corriente directa y 50 grado centígrados con una reducción de 1.04 $\log^{10}$.

Palabras clave: cromatografía líquida, coliformes, color, generador de voltaje, pasteurización,

_____

Francisco Javier Bueso, Ph.

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría	ii
	Página de firmas	iii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimientos	v
	Resumen	vi
	Contenido	vii
	Índice de Cuadros	ix
	Índice de Figuras	x
	Índice de Anexos	xi
1.	**INTRODUCCIÓN**	1
2.	**REVISIÓN DE LITERATURA**	2
2.1	DESCRIPCION DE LA MARACUYA	2
2.2	IMPORTANCIA DE LA VITAMINA C EN LA DIETA HUMANA	2
2.3	CAMPOS ELECTRICOS PULSADOS	3
2.4	METODOS DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C	3
2.4	Cromatografía líquida de alta precisión	3
2.4.2	Método de titulación con 2,6 dicloroindofenol	4
2.5	COLOR	4
2.6	DETECCION DE COLIFORMES	4
3.	**MATERIALES Y MÉTODOS**	5
3.1	LOCALIZACION	5
3.2	MATERIALES	5
3.3	REACTIVOS	5
3.4	EQUIPO	6
3.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	7
3.6	PROCESAMIENTO DE PULPA DE MARACUYA	7
3.7	PROCESO DE ELABORACION DE JUGO DE MARACUYA	7
3.8	APLICACIÓN DE ALTO VOLTAJE Y TEMPERATURA	7
3.9	METODO AGILENT DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C POR HPLC	8
3.10	METODO DE TITULACION CON 2,6 DICLOROINDOFENOL	10

3.11	VALIDACION DEL METODO DE VITAMINA C POR HPLC COMPARADO CON EL METODO OFICIAL AOAC DE DICLOROINDOFENOL	10
4.	**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**.....	11
4.1	CALIBRACION DEL METODO HPLC……...	
4.1.1	Análisis cualitativo……..	
3.1.2	Análisis cuantitativo……	12
4.2	CONCENTRACION DE ACIDO ASCÓRBICO TRATADO TERMICA Y ELÉCTRICAMENTE……...	13
4.4	EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS Y ELÉCTRICOS SOBRE LA CARGA MICROBIANA……...	13
4.5	EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS Y ELÉCTRICOS SOBRE LOS VALORES DE COLOR L*a*b* DEL JUGO DE MARACUYA…….	13
3.6	COMPARACION DE NIVELES DE ACIDO ASCÓRBICO POR HPLC Y TITULACION POR 2,6 DICLOROINDOFENOL EN JUGO DE MARACUYA TRATADO TERMICA Y ELÉCTRICAMENTE…….. ….	14
5.	**CONCLUSIONES**.....	16
6.	**RECOMENDACIONES**.....	17
7.	**BIBLIOGRAFÍA**.....	18
8.	**ANEXOS**	20

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Descripción de los tratamientos…… 7

2. Datos cuantitativos de estándares de ácido ascórbico…… 12

3. Cantidad de vitamina C de cada tratamiento……..… 13

4. Unidades formadoras de colonias de coliformes por mililitro de muestra...….. 13

5. Valor L de las muestras de cada tratamiento……...…..…..... 13

6. Valor a de las muestras de cada tratamiento……...…… 14

7. Valor b de las muestras de cada tratamiento …….…….....…. 14

8. Comparación de datos obtenidos por titulación y HPLC…….....…….. 14

INDICE DE FIGURAS

Figura

1. Estándares de ácido ascórbico…… 11

2. Calibración para ácido ascórbico método HPLC…… 12

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Contenido de vitamina según cromatógrafo líquido del jugo sometido a tratamiento de 120 V + 50°C.....21

2. Contenido de vitamina según cromatógrafo líquido del jugo sometido a tratamiento de 120 V y 28°C.....21

3. Contenido de vitamina según cromatógrafo líquido del jugo sometido a tratamiento de 72 °C.....22

1. INTRODUCCIÓN

La planta Hortofrutícola de Zamorano, se dedica a procesar diversos productos agrícolas primarios, de esta forma da valor agregado a la materia prima que de otra manera sería comercializada a un precio menor y con la limitante de un producto altamente perecedero, lo que simboliza un alto riesgo de pérdidas económicas.

El jugo de maracuyá tiene entre 14.5 y 15.5 grados brix, una relación brix/acidez de 3.1 a 3.7, un ph que va en un rango entre 2.5 y 2.9. Pese a que el jugo de maracuyá posee un pH bajo que no permite la proliferación de muchos microorganismos, es requisito legal que tanto la leche como los jugos de frutas sean pasteurizados antes de ser puestos a la venta.

Los aspectos nutricionales y el valor nutritivo de los alimentos deben estar siempre presentes cuando se procesan. Este es el caso de la degradación de un compuesto termolábil típico: el ácido ascórbico o vitamina C (Alvarado 2006).
Las temperaturas de pasterización van desde 62.8 °C por treinta minutos hasta 71.5 por 15 s (IR Grant 1998). La vitamina C es una sustancia altamente termo sensible, es inestable en condiciones de pH neutro o alcalino además de la pérdida que se da en presencia de oxígeno y luz (FAO 1992).

El uso de nuevas alternativas tecnológicas se presentan con el avance de las ciencias afines a la ingeniería de alimentos, como es el caso de los campos eléctricos pulsados, los cuales son capaces de reducir la carga microbiana manteniendo las propiedades físico-químicas de los alimentos (Taylor & Francis 2000)

El objetivo de este estudio fue encontrar una alternativa de inactivación bacteriana del jugo de maracuyá evitando pérdidas de vitamina C para ser aplicado en la planta Hortofrutícola de Zamorano.

Por medio de este experimento se pudo validar el método de cuantificación de vitamina C por HPLC comparado con el método oficial de la AOAC de titulación. El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de aplicación de voltaje sobre la carga microbiana y el contenido de vitamina C en jugo de maracuyá (Passiflora edulis).Los objetivos específicos fueron desarrollar un método de cuantificación de vitamina C por el método de cromatografía liquida y validarlo, evaluar los cambios en color después de aplicados 3 tratamientos térmicos y eléctricos, evaluar la efectividad en la reducción de la carga microbiológica después de aplicar tres tratamientos térmicos y eléctricos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 DESCRIPCION DE LA MARACUYA

La *Pasiflora Edulis*, mas comúnmente conocida como maracuyá, es una fruta que crece en el trópico, formando una enredadera durante su desarrollo.

De acuerdo al CIESTAAM de México**,** actualmente es una fruta de gran demanda mundial tanto en países de la Unión Europea como en los Estados Unidos y Japón.

Es conocido como la fruta de la pasión debido a cierta relación con sucesos de la pasión de Cristo, y aporta hasta 130% del requerimiento de vitamina C diario a la dieta (FAO, 2001).

2.2 IMPORTANCIA DE LA VITAMINA C EN LA DIETA HUMANA

La vitamina C o ácido ascórbico es una de las vitaminas de mayor importancia en la alimentación humana a nivel mundial.

Según la, deficiencias en los niveles de esta vitamina generan problemas relacionados con la formación de epitelios, producción de hormonas corporales y generación de sustancias neurotransmisoras, además, cumple funciones como antioxidante en alimentos y en el organismo.

De acuerdo a un artículo publicado en la web por nutrinfo en el 2000, esta vitamina fue aislada en 1928 por el bioquímico HúngaroAlbert Szent-Gyorgyl, pero ya existían antecedentes de marineros que en altamar presentaban problemas de escorbuto, además de otros síntomas como desangrado de encías que evidenciaban la deficiencia de vitamina C en sus dietas por no contar con una fuente fresca como cítricos.

Tal como indica el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (IOM 2000) es importante asegurar que la dieta humana cuente con alimentos que presenten una fuente significativa de vitamina C. Se habla de un consumo mínimo de 90 mg diarios en hombres y 75 mg en mujeres, aunque esta dosis puede variar de acuerdo a ciertas necesidades especiales o al estado fisiológico de la persona como es el caso de las mujeres embarazadas.

2.3 CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS

Los campos eléctricos pulsados implican el uso de pulsos de kV/cm del alto voltaje (típicamente 20 - 80) a los alimentos colocados entre 2 electrodos. El tratamiento de campo eléctrico pulsado se aplica a temperatura ambiente o levemente sobre temperatura ambiente en un tiempo menor de 1s.

En cuanto a la preservación del valor nutritivo, la tecnología de PEF se considera superior al tratamiento térmico tradicional de alimentos porque evita o reduce en gran manera los cambios perjudiciales de las características sensoriales y físicas de los alimentos (FDA 2000).

Actualmente esta tecnología no se encuentra disponible de manera comercial, únicamente modelos experimentales en la universidad como la de OHIO STATE y universidades alemanas, por lo que se utilizarán los recursos disponibles para reproducir el principio.

2.4 METODOS DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C

2.4.1 Cromatografía líquida de alta precisión

Mikhail Tswett, un botánico de nacionalidad rusa, uso por primera vez el término “cromatografía” en el año de 1906. El termino cromatografía proviene del griego Chroma relacionado a color y graphein respectivo a escribir. Mikhail comenzó trabajando con vegetales, separando por afinidad sus pigmentos a través de columnas de carbonato de calcio.

Según wikipedia 2000, los primeros equipos de cromatografía de gases aparecieron en el mercado a mediados del siglo XX. A su vez, la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) comenzó a desarrollarse en los años 1960, aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatográfica más empleada. Sin embargo esto se irá modificando con el paso de los años.

Actualmente compañías empresas como Agilent (división médica de Hewlett Packard), se encargan de la producción y mantenimiento de equipo de cromatografía líquida de alta precisión, de igual manera cuenta con representaciones que ofrecen servicio de mantenimiento y accesoria técnica para sus equipos(

Para efectos de este experimento se desarrolló el método recomendado por Agilent de determinación de vitamina C por HPLC (cromatografía líquida de alta precisión) por la velocidad y precisión que este método presenta al momento de realizar los análisis.

2.4.2 Método de titulación con 2,6 Dicloroindofenol

Este es el método oficial AOAC 967.21 para determinar cantidades de vitamina C en alimentos(Vega S). El principio funciona de manera que el ácido ascórbico reduce el 2,6 dicloroindofenol, a una polución menos colora. Al final, el exceso se reduce a un color rosa en soluciones ácidas. La vitamina es extraída y titulada en función a la presencia de una solución de ácido acético con ácido metafosfórico, o una solución de ácido sulfúrico con ácido acético. Para mantener la propiedad de acidez para la reacción y evitar la auto oxidación del ácido ascórbico a un pH alto. Las unidades obtenidas de la titulación estan expresada en mg de vitamina c por gramo de muestra.

2.5 COLOR

El color es una de las principales características físicas que son afectadas durante el procesamiento relacionado a calor.

Los valores L*a*b* fueron usados como parámetros indicadores de los cambios en apariencia después de los tratamientos aplicados, sabiendo que L es el grado de claridad u oscuridad de la muestra, A referente a que tan verde o rojo es la muestra, y B refiriéndose al grado de azul o amarillo de la muestra(Richter 1991)

Para determinar estos valores se uso el colorímetro ColorFlex marca Hunter L*a*b, este instrumento es especial para mediciones de reflectancia en materiales opacos o sólidos translúcidos, polvos y líquidos, se usa con el software de control conectado a una computadora (ISASA 2005).

2.6 DETECCION DE COLIFORMES

De acuerdo a la prensa del Washington Hispanic, uno de los principales problemas por contaminación por coliformes se da por consumo de alimentos contaminados, hamburguesas poco cocidas, vegetales frescos, jugos no pasteurizados y leche cruda.

Tal como afirma el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) existe un desplazamiento de brotes causados por *Escherichia coli* en carne contaminada hacia otras fuentes como leche y jugos no pasteurizados, a partir de 1996.

El método oficial AOAC 989.11 para detección de coliformes totales es usando el medio selectivo para detección de coliformes es (VRBA) agar de color rojo violeta (USDA 2006).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. LOCALIZACION

El estudio se realizó en el centro de evaluación de alimentos de la Universidad Zamorano, localizada a 35 Km. de Tegucigalpa, a una altura de 814 msnm, en el departamento de Francisco Morazán, en la siguientes coordenadas: N 14º Y O 87º, con una precipitación promedio anual de 1,100 mm, y una temperatura promedio anual de 24 ºC.

3.2. MATERIALES

- Frascos volumétricos de 25 y 100 ml
- Probeta de 100 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Papel filtro whatman No 1
- Pipetas volumétricas de 5, 10, y 20 ml
- Embudos
- Filtros de 0.2 um de Nylon
- Viales de 2 ml color ámbar.
- Beaker de 100 ml
- Agua desionizada
- Parafilm
- Cronómetro de precisión.

3.3 REACTIVOS

- Estándar ácido L-ascórbico Sigma Ultra >99% cristalline.
- Solución de acetato de sodio 500 mg NaOAC.3H2O por litro.
- Lavado ácido Norit CAS 744-44-0(Sigma-Aldrich) 329428-2KG.
- Metanol.
- O-Phenylenediamina (OPD) No de parte 34005(Pierce).
- Fosfato de Potasio dibásico(K2HPO4).
- Solución extractora A: 3% MPA (Ácido metafosfórico) en 8% de ácido acético. Solución extractora B: Solución de ácido metafosfórico con ácido acético— Disolver, por medio de mezcla, 15 g de pelets de ácido fosfórico en 40 ml de ácido

acético y 200 ml de agua destilada; se diluye hasta aproximadamente 500 mL, y se filtra rápidamente a través de un papel filtro que va a dar a una botella de vidrio.

- Solución extractora C: Solución de ácido acético con ácido sulfúrico — Se procede de igual manera que en la preparación de la solución anterior, pero se usa 0.15 M de ácido sulfúrico en lugar de agua.
- Solución estándar de ácido ascórbico: 1mg/mL. De manera muy precisa se pesan 50 mg de estándar de ácido ascórbico que ha sido almacenado en un desecador lejos de la luz solar. Se transfiere la masa pesada a un balón volumétrico de 50 mL y se diluye inmediatamente antes de usar con la solución extractora de ácido acético.
- Solución de 2,6 dicloroindofenol: Se disuelve 50 mg de la sal de 2,6 dicloroindofenol sódico, que ha sido almacenado en un desecador sobre limo de soda, en 50 mL de agua la cual ha sido agregada 42 mg de NaHCO3; mezcle vigorosamente, y cuando los sólidos se disuelvan, diluya hasta 200 mL con agua destilada. Se filtra a través de un papel filtro dentro de una botella de vidrio. Mantenga almacenada alejada de la luz solar directa, y se almacena en un refrigerador.

3.4 EQUIPO

- HPLC 1100 Agilent con detector de arreglo de diodos.
- Agitador Magnético.
- Centrífuga.
- Despulpador rotatorio
- Generador de voltaje marca Lincoln
- Hornilla eléctrica
- Termómetro láser
- Medidor de voltaje marca Voltman

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar. Tal como se describe en el Cuadro 1, se usaron dos niveles de voltaje, tres temperaturas y tiempo constante para todos los tratamientos.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos

MUESTRA	VOLTAJE(DC)*	TEMPERATURA	TIEMPO(seg)
control	0	28	15
tratamiento 1	0	72	15
tratamiento 2	120	50	15
tratamiento 3	120	28	15

*DC: corriente directa

3.6 PROCESAMIENTO DE PULPA DE MARACUYA

La fruta utilizada fue *Pasiflora Edulis var. Flavicarpa***,** la cual fue cosechada, colocada en canastas de cloruro de polivinilo, y transportadas a la planta. Una vez en la planta se realiza una selección manual de la materia prima de óptima calidad, la cual es pesada y colocada en la cámara de lavado. La cámara de lavado realiza primero un enjuague con detergente, seguido por un lavado con agua limpia y finalmente una desinfección usando agua a 50 ppm de cloro.

La fruta fue colocada en mesas de acero inoxidable y partida en dos partes. Luego la pulpa con semilla es colocada en un molino despulpador el cual separa por un lado las semillas y por otro la pulpa.

3.7 PROCESO DE ELABORACIÓN DE JUGO DE MARACUYA

Una vez obtenida la pulpa de maracuyá, fue combinada con azúcar, benzoato de sodio, ácido cítrico y calentado hasta 72 °C para lograr obtener una concentración final de 15 grados brix.

3.8 APLICACIÓN DE ALTOVOLTAJE Y TEMPERATURA

- Se colocaron 200 ml de jugo de maracuyá en 8 beakers de vidrio.
- Se tapó la boca de los beakers con parafilm, se cubrió el beaker por completo con papel aluminio y se rotuló de la siguiente manera:

1. 120V 28°C rep 1
2. 120V 28°C rep 2
3. 120V 50°C rep 1
4. 120V 50°C rep 2
5. 72°C rep 1
6. 72°C rep 2
7. control 1
8. control 2

- El experimento consta de 4 tratamientos con dos repeticiones cada uno: control, aplicación de 120V y 50°C durante 15s, aplicación de 120V y 28°C durante 15s y aplicación de 72°C.
- Para elevar hasta la temperatura necesaria se usó una hornilla de resistencia eléctrica con agitador magnético, verificando la temperatura con un termómetro láser.
- La aplicación de voltaje se la realizó usando dos electrodos de cobre, y esterilizados por método de flameado con alcohol y fuego antes de la aplicación del tratamiento.
- Se controló el tiempo usando el cronómetro de precisión, la temperatura con el termómetro láser, y en caso de los tratamientos eléctricos, se revisó el voltaje usando el voltímetro Voltman.

3.9 METODO AGILENT PARA CUANTIFICACION DE VITAMINA C

Se desarrolló una curva de calibración para determinar la cantidad de vitamina C en un alimento, usando extracciones químicas de estándares puros de ácido ascórbico.

Se usaron concentraciones de 0.19, 0.38, 0.76, 1.52, 3.04, 6.08, 12.16 y 24.32 ug de vitamina C por gramo de extracto.

El procedimiento usado fue el siguiente:

- Pesar 0.0608g. y se disolvió con la solución extractora en un volumétrico de 100 ml
- Transferencia del contenido a un erlenmeyer que contiene 2 g. de Norit.
- Agitación por 45 segundos con el agitador magnético.
- Filtración recibiendo el filtrado en un erlenmeyer de 250 ml.
- Transferir una alicota de 20 ml a un frasco volumétrico de 100 ml que contiene 5 ml de la solución de acetato de sodio y 55 ml de Metanol.
- Dilución al volumen con agua y agitar.
- Después se filtró recibiendo el filtrado en un erlenmeyer de 250 ml.
- Se transfirió 20 ml del filtrado a un volumétrico de 100 ml conteniendo 10 ml de la solución de OPD (2.5 mg/ml, 0.0625g para 25 ml).
- Una vez realizado esto, se diluyó al volumen con agua

- La concentración de este estándar es de 24.32ug de vitamina C por cada gramo de extracto, por lo que se tomaron 5 ml de la solución y se diluyó a la mitad con agua destilada para obtener una solución de 12.16 ug/g. De igual forma se toman 5 ml de esta solución y se diluyen con 5 ml de agua destilada.
    - El proceso debe repetirse hasta obtener una solución de 0.19 ug/g
- Filtración con filtros de 0.2 um. Usando la jeringa.
- Se colocó en el HPLC y se realizaron 3 corridas por cada nivel de vitamina, de esta manera se identificó el rango del tiempo de elusión de la vitamina.
    - De igual manera, se pudo identificar el área promedio del pico correspondiente a cada nivel.

Condiciones cromatográficas para el HPLC

- Columna, XDB C18 15 cm x 4.6 mm , 5 um.
- Fase móvil, solvente A Buffer de fosfato 0.08 M a pH 7.0 (pesar 13.934 g. y diluir a un litro de agua desionizada, ajustar a pH 7.0 +/- 0.02 con ácido fosfórico diluido y filtrar) solvente B metanol.
- Establecer en la bomba cuaternaria las siguientes condiciones, Flujo 1 ml/min, 78% de la solvente A y 22 % del solvente B.
- Condiciones del detector, longitud de excitación 355 nm, longitud de emisión 430

Se obtuvo una tendencia lineal entre la relación de concentración de vitamina C y el área bajo la curva mostrada por el HPLC.

De esta manera se puede identificar la concentración desconocida de vitamina C de cualquier alimento.

Se usaron 40 gramos de muestra por cada tratamiento y se mezcló con 100 ml de solución extractora A, para ser colocado en una centrífuga a 4000 rpm durante 8 minutos a 24 grados centígrados de temperatura ambiente.

Posterior a esto, se coloca la fase líquida en un beaker con 2 gramos de carbón activado Noria, se agitó por 45 segundos con el agitador magnético, se filtró recibiendo el filtrado en un erlenmeyer de 250 ml.

Se transfirió una alicota de 20 ml a un frasco volumétrico de 100 ml que contiene 5 ml de la solución de acetato de sodio y 55 ml de metanol, para luego diluir al volumen con agua.

Después se filtró recibiendo el filtrado en un erlenmeyer de 250 ml.

Se transfirió 20 ml del filtrado a un volumétrico de 100 ml conteniendo 10 ml de la solución de OPD.

Una vez realizado esto, se diluyó al volumen con agua, se filtro usando una jeringa de vidrio con un filtro adaptado de 0.2 um dentro de un vial.

Se encendió la bomba cuaternaria y se dejo fluir la fase móvil durante aproximadamente 15 minutos hasta que la línea base del cromatógrafo se estabilice para poder inyectar y realizar la lectura de la muestra.

3.10 MÉTODO DE TITULACION CON 2,6 DICLOROINDOFENOL.

El proceso de titulación fue el siguiente:

1) Se colocaron 50 mg de ácido ascórbico estándar en 50 ml de solución extractora, así obtenemos una concentración de 1000 ppm, o una solución de concentración de 1 mg de ácido ascórbico en un mililitro de solución extractora.
2) De la solución anterior se tomaron 2 ml y se le agregan 5 ml de solución extractora, el volumen final de 7 ml se titula con la solución preparada de 2,6 dicloroindofenol. El valor aproximado teórico debe ser alrededor de 15 ml.
3) A continuación se usaron 2 ml de la solución estándar de ácido ascórbico, y se le agregan 5 ml de solución extractora, para después agregar el mismo volumen de diclorofenol pero usando agua destilada, estos son los blancos y deben ser repetidos 3 veces.
4) Para preparar la muestra de jugo se homogenizó la muestra de jugo y filtrar.
5) Se colocaron 2 ml de la muestra de jugo con 5 ml de solución extractora, y titular con solución de 2,6 dicloroindofenol

3.11 VALIDACIÓN DEL METODO DE VITAMINA C POR MEDIO DEL USO DE HPLC TOMANDO COMO REFERENCIA EL METODO DE TITULACIÓN OFICIAL DE LA AOAC DE 2,6 DICLOROINDOFENOL

- Para la determinación de vitamina C de los distintos tratamientos se usó el método de HPLC. El método de extracción química para un alimento es el mismo que se usó para preparar el estándar. Se usaron 3 repeticiones
- Para comprobar la efectividad del método Agilent de determinación de vitamina C reportando los datos en mg de ácido ascórbico por 40g de jugo. Se utilizó también el método de titulación de 2,6 dicloroindofenol por medio de titulación, usando 3 repeticiones de cada tratamiento y reportando los datos en mg de ácido ascórbico por gramo de jugo.
- Al final se compararon los resultados por los dos métodos usando el programa estadístico SAS® para confirmar si son estadísticamente iguales.

4. RESULTADOS

4.1 CALIBRACION DEL METODO HPLC.

4.1.1 Análisis cualitativo.

En la Figura 1 se pueden apreciar los estándares corridos por triplicado en el HPLC, se identificó que todos los niveles de ácido ascórbico levantaron un pico en un tiempo de retención promedio de 4.27 minutos con una desviación estándar de 0.0259.

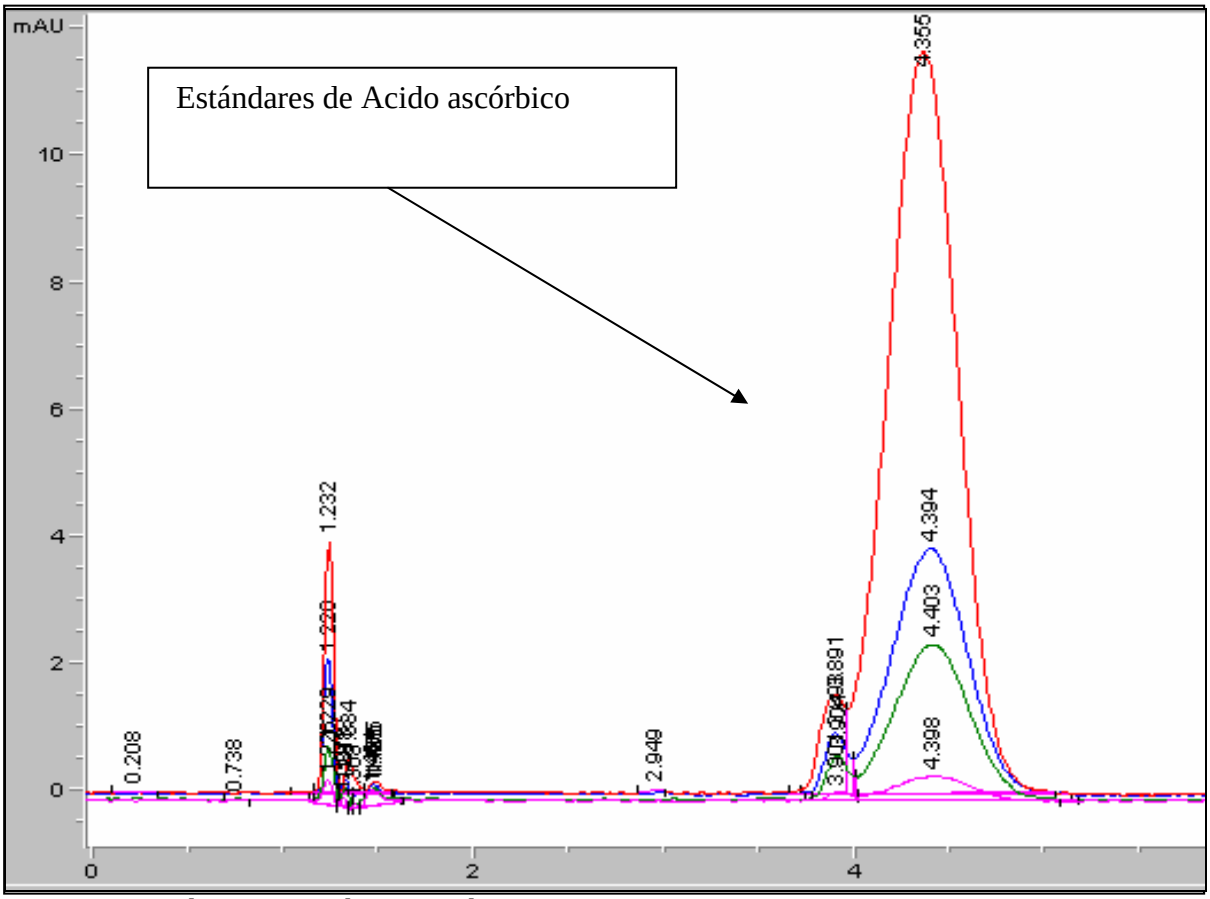


Figura 1. Estándares de ácido ascórbico

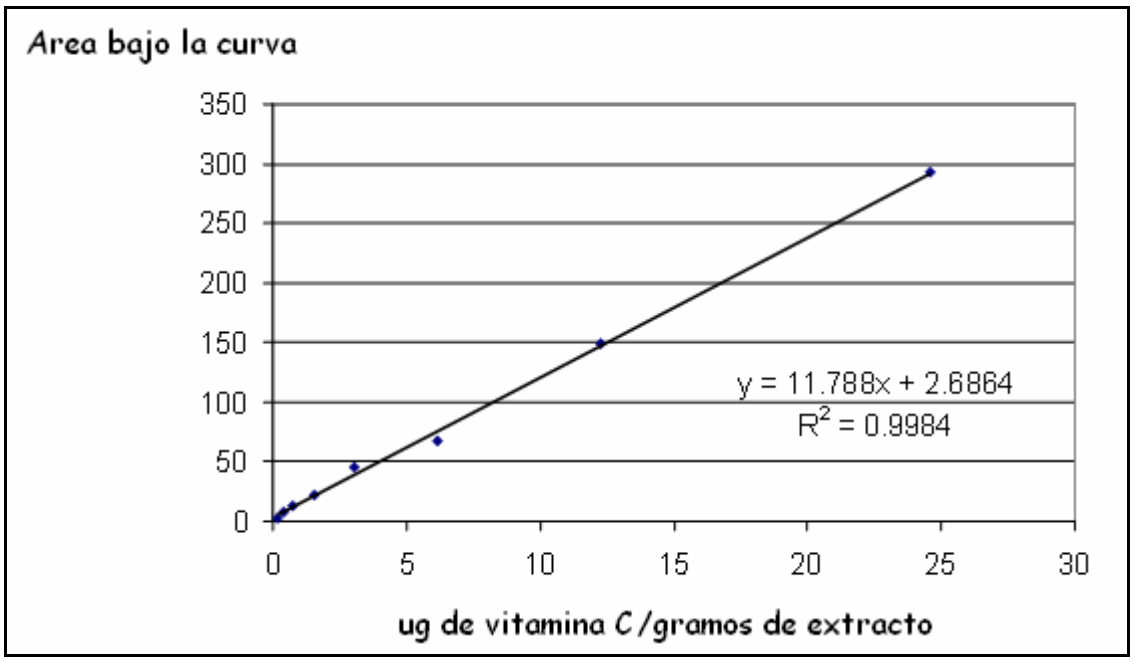


Figura2. Calibración para ácido ascórbico método HPLC

En la Figura 2 se observa que el 99.84% de los datos se ajustan a un modelo lineal determinado por la ecuación. y = 11.788x + 2.6864, por lo que el método desarrollado cuenta con la precisión necesaria para poder ser usada en laboratorio.

3.1.2 Análisis cuantitativo

Cuadro 2. Datos cuantitavos de estándares de ácido ascórbico

ug ácido ascórbico^	área promedio Δ	desviación estándar	% CV
24.56	296.74	3.51	1.18
12.28	149	4.39	2.95
6.14	66.87	3.46	5.17
3.07	44.83	1.42	3.17
1.54	21.6	0.44	2.04
0.77	12.5	0.23	1.84
0.38	7.87	0.21	2.67
0.19	2.87	0.04	1.50

^ Microgramos de ácido ascórbico inyectados en el HPLC
Δ Área bajo la curva promedio correspondiente a su respectivo nivel de ácido ascórbico.

En el Cuadro 2 se observa que el coeficiente de variación de las áreas obtenidas en el cromatograma correspondiente a cada nivel de inyección, es bajo a excepción del nivel de 6.14ug de ácido ascórbico.

3.2 CONCENTRACION DE ACIDO ASCÓRBICO TRATADO TERMICA Y ELÉCTRICAMENTE.

Tal como se aprecia en la Cuadro 3, se observaron pérdidas considerables de vitamina en todos los tratamientos usados con respecto al control.

Cuadro 3. Cantidad de vitamina C de cada tratamiento.*

MUESTRA	Ug acido ascórbico^
Control	0.50806± 0.01980 A
72 °C	0.02810± 0.00915 C
120 V + 50 °C	0.37942± 0.06240 B
120 V + 28 °C	0.37220± 0.06453 B

^ Cantidades en mg de vitamina C por 100 gramos de alimento.

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\propto$<0.05).

En el Cuadro 3, podemos apreciar que el tratamiento de 120 V + 50 °C y el tratamiento de 120 V + 28°C, fueron estadísticamente ($\propto$<0.05) similares. Pese a esto son diferentes comparados con el control, con valores más altos respecto al tratamiento tradicional de pasteurización

3.4 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS Y ELÉCTRICOS SOBRE LA CARGA MICROBIANA.

Cuadro 4. Unidades formadoras de colonias de coliformes por mililitro de muestra.*

MUESTRA	Log 10
Control	2.08± 0.03A
72 °C	0.01± 0.23 D
120 V + 50 °C	1.04± 0.11 C
120 V + 28 °C	1.98± 0.03 B

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\propto$<0.05).

Como se muestra en el Cuadro 4, el tratamiento de pasteurización corriente fue el más efectivo en cuanto a destrucción microbiológica, y ningún tratamiento mostró ser estadísticamente (P<0.05) tan efectivo como el proceso tradicional de pasteurización, aunque el más cercano es el tratamiento de 120 V + 50 °C.

3.5 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS Y ELÉCTRICOS SOBRE LOS VALORES DE COLOR L*a*b* DEL JUGO DE MARACUYA

Cuadro 5. Valor L de las muestras de cada tratamiento.*

MUESTRA	Valor L
Control	48.9975 ±0.6695 B
72 °C	50.8125 ±0.1251 A
120 V + 50 °C	46.9200 ±0.9724 C
120 V + 28 °C	48.5975 ±0.2780 B

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes($\propto$<0.05).

De acuerdo al análisis estadístico, el tratamiento de 120 V y 50 grados centígrados no presentó diferencias significativas ($\propto<0.05$), en sus valores L de oscurecimiento.

El tratamiento de 72 °C, presentó un oscurecimiento significativo($\propto<0.05$), y el tratamiento de 120 V + 28 °C mantuvo su color en el valor L*, en comparación al control.

Cuadro 6. Valor a de las muestras de cada tratamiento.*

MUESTRA	Valor a
Control	16.1925±0.4223 A
72 °C	16.2050±0.2400 A
120 V + 50 °C	14.3750±0.7129 C
120 V + 28 °C	15.2200±0.4003 B

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\propto<0.05$).

Como se aprecia en el Cuadro 6 el tratamiento de 72 °C no presentó diferencia significativa($\propto<0.05$) en valor a* comparado con el control, mientras que los dos tratamientos eléctricos presentaron un cambio de color acercándose a un verde el cual estadísticamente es diferente al control($\propto<0.05$).

Cuadro 7. Valor b de las muestras de cada tratamiento.

MUESTRA	Valor b
Control	60.850± 2.731 A
72 °C	57.175± 1.002 B
120 V + 50°C	47.390± 2.274 C
120 V + 28°C	59.850± 1.038 A

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\propto<0.05$).

Tal como indica el Cuadro 7, el tratamiento de 120 V + 28°C, no presentó cambios estadísticamente significativos($\propto<0.05$) entre las medias de los valores b* comparados con el l control, mientras que el tratamiento de 120 V + 50°C y 72°C sí presentó cambios significativos ($\propto<0.05$) comparados con el control.

3.6 COMPARACION DE NIVELES DE ACIDO ASCÓRBICO POR HPLC Y TITULACION POR 2,6 DICLOROINDOFENOL EN JUGO DE MARACUYA TRATADO TERMICA Y ELÉCTRICAMENTE

Cuadro 8. Comparación de datos obtenidos por titulación y HPLC.*

METODO	Niveles de ácido ascórbico
HPLC	0.32195±0.001428 A
Titulación	0.30125±0.002327 A

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($\propto<0.05$).

En el Cuadro 8 se observa que todos los niveles de vitamina fueron detectados por el método de titulación y HPLC. Los datos fueron correlacionados y los dos métodos fueron estadísticamente iguales ($\propto<0.05$).

5. CONCLUSIONES

El método de cuantificación de vitamina por HPLC fue más preciso e igual de exacto que el método oficial de 2,6 dicloroindofenol

El tratamiento que presentó mayores reducciones en la carga de coliformes y menor pérdida de vitamina C fue el de 120 V y 50 °C.

El tratamiento de 120 V y 28 °C presentó el menor cambio en características de color comparado con el control.

6. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de análisis sensorial para determinar si los consumidores detectan cambios entre los tratamientos.

Evaluar voltajes más altos con tiempos más prolongados.

Continuar usando el tratamiento tradicional de pasteurización para mantener seguro el alimento de cualquier contaminación de tipo microbiológico.

Evaluar voltajes más altos con tiempos más prolongados, y evaluar el efecto sobre la carga microbiana y calidad del jugo, respecto a vida de anaquel.

7. BIBLIOGRAFÍA

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Maryland. USA.

Richter 1991. Espacio de color L*a*b*. Disponible en: http://en.wikipedia.org/wiki/Lab_color_space Consultado el 28 de septiembre de 2006. Consultado el 12 de Agosto de 2005.

Vega S 2000. Estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina en alimentos infantiles instantáneos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Disponible en: http://grad.uprm.edu/tesis/sotovega.pdf. Consultado el 13 de Noviembre de 2005.

Quass 1997. Campos eléctricos pulsados. Disponible en : http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-pef.html. Consultado 12 de Agosto de 2006.

USDA (United Status Department of Agriculture) 2006. Guía para laboratorio de microbiología. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab. Consultado el 29 de Septiembre de 2006

FAO 1992. Carencia de vitamina y escorbuto. Disponible en: http://www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s0n.htm. Consultado el 11 de Abril de 2006

FAO 2001. Vitamin C. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/004/Y2809E/y2809e0c.htm. Consultado el 13 de Septiembre de 2005.

Wikipedia 2000. Historia de la cromatografía 2006. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa. Consultado el 18 de Octubre de 2006.

ISASA 2005. Instrumentación y servicios analíticos. Disponible en: http://www.isasaleon.com.mx/productos/hunter021.htm. Consultado el 14 de Agosto de 2006.

[IOM] Institute of Medicine of the National Academies. 2004. Dietary Reference Intakes: Vitamin. Washington, D.C.. Disponible en: http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/296/webtablevitamins.pdf Consultado el 14 Junio de 2006.

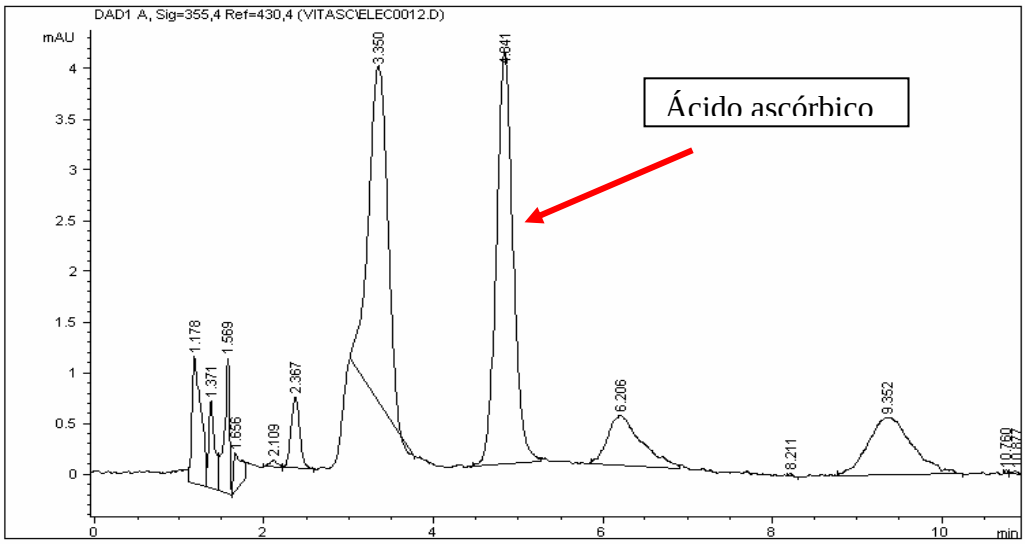
IR GRANT. 1998. .Maracuyá congelado, jugo natural y concentrado. Disponible en http://www.agrotropical.andes.com/frutas_tropicales_maracuya_pulpas_concentrados.htm Consultado el 15 de Agosto de 2006.

Alvarado 2006 Principios de ingeniería aplicados a alimentos. Disponible en: www.science.oas.org/Simbio/prin_ali/principios.pdf. Consultado 23 de Agosto de 2006.

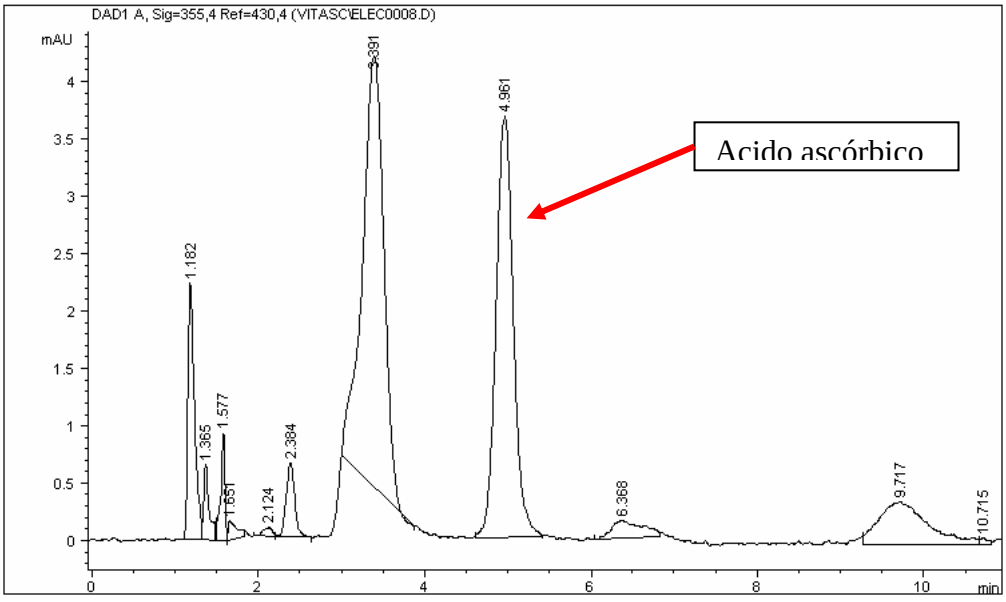
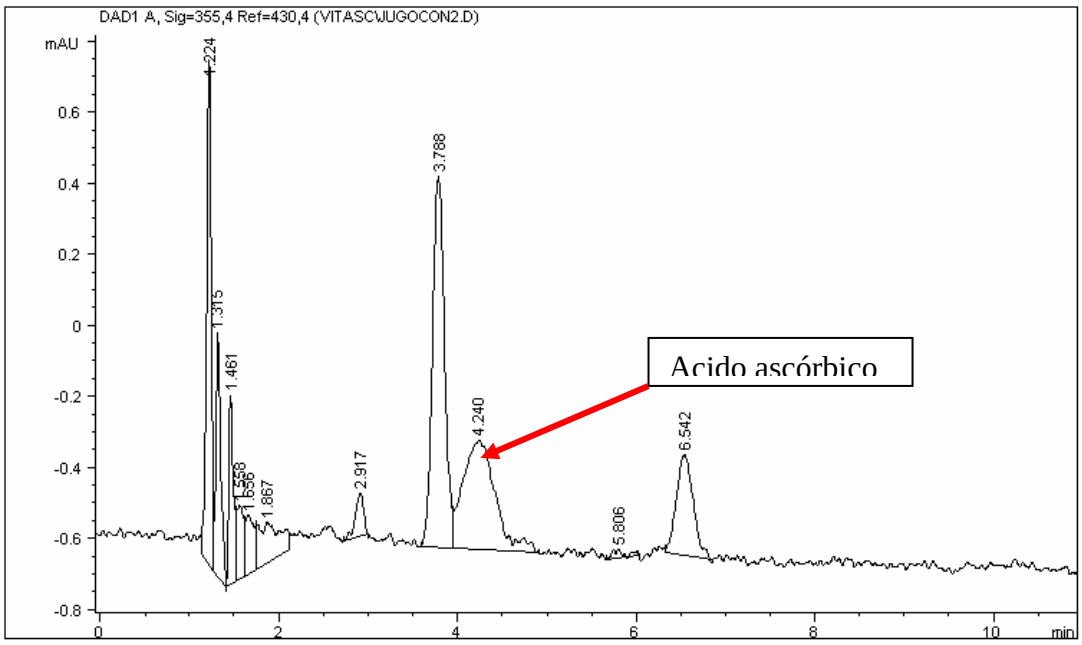
Nutrinfo 2000. Vitamina C, estructura, absorción y metabolismo. Disponible en: http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/vitc0.htm.l. Consultado 12 de Noviembre de 2005.

8. ANEXOS

Anexo 1. Contenido de vitamina C según cromatógrafo líquido del jugo sometido a tratamiento de 120 V + 50°C



Anexo 2. Contenido de vitamina C según cromatógrafo líquido del jugo sometido a tratamiento de 120 V y 28°C



Anexo 3. Contenido de vitamina C según cromatógrafo líquido del jugo sometido a tratamiento de 72 °C