

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Escuela de Tecnología de Alimentos

Proyecto Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Evaluación del efecto de la microfiltración tangencial sobre las propiedades físico-químicas, características sensoriales y estabilidad microbiológica de agua de pipa (*Cocos nucifera* L.) durante el almacenamiento en refrigeración

Sofía Naranjo Ruiz

Carné: A84506

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2014

TRIBUNAL EXAMINADOR

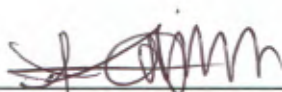
Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:
Sofía Naranjo Ruiz

Aprobado por:



M.Sc. Carmela Velázquez Carrillo
Presidenta del Tribunal



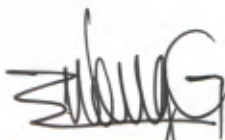
Lic. Marvin Soto Retana
Director del Proyecto



Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Asesora del Proyecto



Dr. Fabrice Vaillant Barka
Asesor del Proyecto



Ph.D. Eric Wong González
Profesor designado

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

El presente proyecto de graduación posee confidencialidad parcial. La confidencialidad representa una protección para la empresa interesada frente a posibles competidores. Por lo anterior, el documento se publica restringiendo y codificando información que represente un riesgo para la empresa.

DEDICATORIA

*A Dios, a la Universidad de Costa Rica, a la vida, a la alegría y
emprendimiento.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a esa fuerza, ganas de salir adelante y motor de vida: Dios, la motivación y la voluntad. Por brindarme el apoyo y herramientas para desarrollarme como estudiante y futura profesional, gracias a la Universidad de Costa Rica. Por la ayuda y apoyo incondicional, gracias a mis padres, hermano y familia. Gracias al CITA y a la empresa interesada, por permitirme ser parte del proyecto, por el apoyo científico y financiero. Agradecida con los proyectos: N° 735-A2-502 y N° 735-B2-062: “Desarrollo de alternativas tecnológicas innovadoras para la transformación de frutas tropicales” y “Evaluación del efecto de tecnologías emergentes (tratamientos no térmicos) para el procesamiento de frutas y jugos de frutas sobre su valor como alimento funcional” respectivamente.

Por su ayuda, solidaridad, transmisión de conocimiento, resolución de dudas en todo momento, constancia, dedicación y preocupación por el proyecto, agradezco a Marvin. Por la confianza, dedicación, colaboración e incondicional ayuda, agradezco a Ana Mercedes. Por los grandes aportes y apoyo durante el proyecto, gracias a Fabrice. Por la colaboración y consejos a María Laura y Carolina. Por la colaboración, disposición, paciencia, materia prima y envases, agradezco a Sebastián y a todo el personal de la empresa. Por la disposición y amabilidad, gracias don Jonhy.

A la solidaridad, amistad, ayuda, confianza e incondicionalidad, un agradecimiento especial a Cris, quien estuvo conmigo en todo momento. A mis amigos y compañeros que siempre estuvieron anuentes a ayudarme: Diego, Pili, Raque, Glori, Pri, Nacho. Por los cantos en planta piloto y toda la ayuda, gracias a Camacho y Alonso. Por los consejos y ayuda microbiológica, gracias a Vanny, Marcy y Ale. A Giova y Luis por su ayuda en el laboratorio de química.

Por su motivación durante toda la carrera, gracias a la profe Sandra. Por sus múltiples consejos de vida, gracias Yorle. A todo el personal del CITA y la ETA quienes de alguna manera colaboraron. A todos mis compañeros y amigos de la carrera, de quienes me llevo momentos inolvidables y experiencias de vida, a Abea, Vale, Pau, Mabel, Jose, Adri, Orlando y a todos los demás porque de cada uno guardo excelentes recuerdos.

Agradezco todo este proceso, que me permitió un gran aprendizaje de vida, adquirir confianza, solidaridad, lucha y emprendimiento; porque me brindó enseñanzas que no se obtienen en una clase. “Para tener sabiduría es necesario tener fuerza interior. Sin un desarrollo interno, podemos perder la confianza en nosotros mismos y el valor. Lo imposible puede ser posible con fuerza de voluntad”. D.L.

ÍNDICE GENERAL

1	JUSTIFICACIÓN	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivo General	5
2.2	Objetivos Específicos	5
3	MARCO TEÓRICO	6
3.1	Generalidades de la planta de coco.....	6
3.1.1	Producción mundial de coco	7
3.1.2	Producción de coco en Costa Rica	8
3.2	Generalidades del agua de pipa	9
3.2.1	Industrialización y comercialización de agua de pipa	12
3.2.2	Parámetros de calidad del agua de pipa	12
3.3	Tecnologías de membranas	14
3.3.1	Principales tecnologías de membranas.....	16
3.3.2	Microfiltración de jugos de frutas.....	18
3.3.3	Parámetros utilizados en microfiltración tangencial (MFT)	19
3.3.3.1	Flujo de permeado (J_p).....	19
3.3.3.2	Factor de reducción volumétrica (FRV).....	19
3.3.3.3	Presión transmembranaria (P_{tm})	20
3.3.3.4	Temperatura	20
3.3.3.5	Velocidad tangencial (U).....	21
3.3.3.6	Turbidez.....	21
3.4	Sistemas de envasado en jugos.....	22
3.4.1	Aplicación de radiación Ultravioleta (UV –C)	23
3.4.2	Uso de atmósferas modificadas.....	26
3.4.2.1	Dióxido de carbono (CO_2)	26
3.4.2.2	Nitrógeno (N_2).....	26
4	MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1	Diagnóstico de la situación actual de la empresa	27
4.2	Localización del proyecto	29
4.3	Materias primas.....	29

4.4	Envases	29
4.5	Descripción del equipo	29
4.6	Pruebas preliminares.....	32
4.6.1	Funcionamiento del equipo.....	32
4.6.2	Estudio de almacenamiento preliminar	33
4.6.3	Desinfección de envases	33
4.7	Pruebas definitivas	36
4.7.1	Estudio de almacenamiento de agua de pipa	36
4.7.2	Evaluación del desempeño de la microfiltración tangencial de agua de pipa (<i>Cocos nucifera</i> L.)	38
4.7.3	Proceso de microfiltración tangencial durante ensayos de larga duración	38
4.7.4	Preferencia del agua de pipa microfiltrada y envasada con luz UV respecto al agua de pipa procesada actualmente por la empresa procesadora	39
4.8	Métodos de análisis.....	39
4.8.1	Métodos de análisis físico-químicos	39
4.8.1.1	Determinación del pH	39
4.8.1.2	Determinación de sólidos solubles	39
4.8.1.3	Determinación de turbidez.....	39
4.8.1.4	Determinación de color.....	40
4.8.2	Métodos de análisis microbiológicos.....	40
4.8.3	Métodos de análisis sensoriales	41
4.8.3.1	Prueba de diferencia para evaluación de la desinfección de las botellas	41
4.8.3.2	Análisis sensorial descriptivo para estudio de almacenamiento	41
4.8.3.3	Pruebas de agrado sensorial para estudio de almacenamiento.....	42
4.8.3.4	Prueba de preferencia.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Pruebas preliminares.....	43
5.1.1	Funcionamiento del equipo.....	43
5.1.1.1	Determinación de la presión óptima de proceso para la MFT de agua de pipa ...	43
5.1.1.2	Evaluación de sólidos solubles al utilizar distintas presiones.....	44
5.1.1.3	Comportamiento de parámetros operacionales	45
5.1.2	Estudio de almacenamiento preliminar	47

5.1.2.1	Evaluación del uso de ácido L- ascórbico como inhibidor enzimático	47
5.1.2.2	Parámetros físico-químicos	48
5.1.2.3	Sólidos solubles.....	49
5.1.2.4	pH.....	50
5.1.2.5	Color	50
5.1.2.6	Turbidez.....	51
5.1.2.7	Recuento total aerobio.....	53
5.1.2.8	Recuento de mohos y levaduras.....	54
5.1.3	Desinfección de envases	55
5.1.3.1	Reducción logarítmica de E. coli	55
5.1.3.2	Prueba sensorial de diferencia	57
5.2	Pruebas definitivas	59
5.2.1	Estudio de almacenamiento del agua de pipa.....	59
5.2.1.1	Turbidez.....	59
5.2.1.2	Recuento de mohos y levaduras (RML).....	61
5.2.1.3	Recuento total aerobio (RTA)	63
5.2.1.4	Cambio de color (ΔE).....	66
5.2.1.5	pH.....	67
5.2.1.6	Sólidos solubles.....	69
5.2.2	Evaluación de distintos materiales de empaque	70
5.2.3	Evaluación de la MFT en agua de pipa sobre las propiedades sensoriales durante el almacenamiento	72
5.2.3.1	Análisis sensorial descriptivo.....	72
5.2.3.2	Pruebas de agrado	74
5.2.4	Evaluación del desempeño de la microfiltración tangencial del agua de pipa.....	76
5.2.5	Evaluación del proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa durante ensayos de larga duración	80
5.2.6	Evaluación de la preferencia sensorial.....	84
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
6.1	Conclusiones	86
6.2	Recomendaciones	87
7	BIBLIOGRAFÍA CITADA	89

8	ANEXOS	100
8.1	Resultados de prueba sensorial de diferencia para desinfección de envases	100
8.2	Análisis de varianza para el estudio de almacenamiento definitivo	101
8.3	Análisis de varianza para evaluación sensorial de agua de pipa.	104
8.4	Procedimiento de limpieza de equipo piloto de MFT.....	105

Índice de cuadros

Cuadro I. Clasificación botánica de la planta de coco.....	6
Cuadro II. Propiedades nutricionales promedio reportadas para el agua de pipa (tamaño de porción = 100 mL).....	10
Cuadro III. Parámetros de calidad establecidos para agua de pipa.....	13
Cuadro IV. Características de procesos de tecnologías de membranas que utilizan presión como fuerza motriz.....	16
Cuadro V. Métodos de análisis a realizar para cada prueba utilizando agua de pipa con diferentes métodos de envasado.....	36
Cuadro VI. Cronograma de muestreo y codificación de las muestras para el estudio de almacenamiento de agua de pipa de una prueba con diferentes métodos de envasado.....	37
Cuadro VII. Evaluación del uso de ácido L- ascórbico como inhibidor enzimático en agua de pipa microfiltrada.....	47
Cuadro VIII. Valor de pH promedio del agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C.....	50
Cuadro IX. Cambio de color del agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C.....	51
Cuadro X. Resultados obtenidos a partir del estándar Mc Farland realizado en la prueba de desinfección.....	56
Cuadro XI. Resultados de recuento de <i>E. coli</i> obtenidos en las botellas desinfectadas con <i>Desinfectante I</i> ® a Y ppm durante Z minutos por inmersión.....	56
Cuadro XII. Resultados obtenidos en la prueba triangular realizada para agua de pipa envasadas en botellas con y sin desinfectar.....	58
Cuadro XIII. Cambio de color presentado en agua de pipa microfiltrada (MFT) y microfiltrada- envasada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C.....	66
Cuadro XIV. Evaluación de <i>E. coli</i> en agua de pipa MFT con 30 días de almacenamiento a 4 °C utilizando distintos materiales de empaque.....	71
Cuadro XV. Valores promedio de intensidad de sabor agrio para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	73
Cuadro XVI. Valores promedio de intensidad de turbidez para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	74
Cuadro XVII. Valores promedio de agrado para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	75
Cuadro XVIII. Características físico-químicas del agua de pipa utilizada como materia prima para la evaluación de los flujos de permeado durante la microfiltración tangencial.....	77
Cuadro XIX. Valores de flujo de permeado de agua de pipa microfiltrada a distintos valores de FRV al utilizar materia prima con alta y baja turbidez.....	78
Cuadro XX. Evaluación del efecto de la velocidad tangencial sobre el flujo de permeado y rendimiento de la operación de MFT de agua de pipa.....	82
Cuadro XXI. Resultados de prueba de preferencia realizada al comparar el agua de pipa microfiltrada con el agua de pipa actualmente procesada.....	84
Cuadro XXIV. Análisis de varianza para la evaluación del pH de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	101
Cuadro XXV. Parámetros estimados para la evaluación del pH de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	101
Cuadro XXVI. Análisis de varianza para la evaluación de los sólidos solubles (°Brix) de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	101

Cuadro XXVII. Parámetros estimados para la evaluación de sólidos solubles (°Brix) de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	101
Cuadro XXVIII. Análisis de varianza para la evaluación de la turbidez de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.	102
Cuadro XXIX. Parámetros estimados para la evaluación de la turbidez de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.	102
Cuadro XXX. Análisis de varianza para la evaluación del recuento de mohos y levaduras de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.....	102
Cuadro XXXI. Parámetros estimados para la evaluación del recuento de mohos y levaduras de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.	103
Cuadro XXXII. Análisis de varianza para la evaluación del recuento total aerobio de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.	103
Cuadro XXXIII. Parámetros estimados para la evaluación del recuento total aerobio de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.	103
Cuadro XXXIV. Análisis de variancia para evaluación de intensidad de sabor agrio para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.	104
Cuadro XXXV. Evaluación de intensidad de turbidez para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.	104
Cuadro XXXVI. Evaluación de agrado general para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.	104
Cuadro XXXVII. Procedimiento de limpieza del equipo piloto de MFT (CITA, 2013).	105

Índice de figuras

Figura 1. Planta de coco.....	6
Figura 2. Fruto del coco (adaptado de Hammer, 2012).....	7
Figura 3. Producción mundial de coco (adaptado de González, 2005).....	8
Figura 4. Crecimiento de la fruta del coco (Adaptado de Prades <i>et al.</i> , 2012).....	10
Figura 5. Modelos de operación de separación de membranas. (a) Flujo frontal (b) Flujo transversal (Adaptado de Muthukumarappan & Marella, 2010).....	15
Figura 6. Niveles de separación en los procesos de membranas que utilizan la presión como fuerza motriz (Adaptado de Romero, 2010).	17
Figura 7. Espectro de radiación electromagnética (Adaptado de Koutchma <i>et al.</i> , 2009).....	25
Figura 8. Flujo de proceso para elaboración de agua de pipa realizado en la empresa procesadora de frutas y hortalizas.	28
Figura 9. Esquema del sistema de llenado con luz UV acoplado al proceso de microfiltración tangencial.	31
Figura 10. Procedimiento realizado para evaluación de la desinfección de envases contenedores de agua de pipa.	34
Figura 11. Procedimiento realizado para las botellas sin desinfectar analizadas sensorialmente.	35
Figura 12. Procedimiento realizado para las botellas desinfectadas analizadas sensorialmente.	35
Figura 13. Diagrama del espacio colorimétrico para los parámetros L* a* y b* (Hunter Lab, 2003).	40
Figura 14. Comportamiento del flujo de permeado respecto a la presión transmembranaria utilizada en la MFT de agua de pipa.	43
Figura 15. Comportamiento del flujo de permeado (J_p) y FRV de agua de pipa durante un ensayo preliminar de MFT ($T = L \pm 1^\circ\text{C}$, $P = P \text{ bar}$).	46
Figura 16. Evaluación del uso de ácido L- ascórbico como inhibidor enzimático en agua de pipa microfiltrada (a) con V ppm y (b) con T ppm.	48
Figura 17. Sólidos solubles promedio ($^\circ\text{Brix}$) de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 2$).	49
Figura 18. Turbidez promedio de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 2$). Barras indican desviación estándar.....	52
Figura 19. Recuento Total Aerobio (RTA) de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 2$). Barras indican desviación estándar.....	53
Figura 20. Recuento de Mohos y Levaduras (RML) de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 2$). Barras indican desviación estándar.	54
Figura 21. Turbidez promedio de agua de pipa MFT y agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 9$) Barras indican intervalo de confianza al 95%.	60
Figura 22. Recuento logarítmico de mohos y levaduras presentes en agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada-ensada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 9$). Barras indican intervalo de confianza al 95%.	62
Figura 23. Recuento Total Aerobio (RTA) presente en agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada-ensada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C . Datos expresados como promedio ($n = 9$). Barras indican intervalo de confianza al 95%.	64
Figura 24. Tinción de Gram de agua de pipa MFT+ CUV.....	65

Figura 25. pH de agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada- envasada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. (n= 9). *Ecuación asociada al pH del agua de pipa MFT durante el tiempo. ** Ecuación asociada al pH del agua de pipa MFT+CUV durante el tiempo.	68
Figura 26. Sólidos solubles (°Brix) del agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada- envasada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n=9). Barras indican intervalo de confianza al 95%.	70
Figura 27. Evaluación 1 de flujo de permeado (Jp) y FRV respecto al tiempo de proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa (T= L ± 1 °C; P= P bar; Ti1=8,8 NTU; Ti2= 7,0 NTU).	78
Figura 28. Evaluación 2 de flujo de permeado (Jp) y FRV respecto al tiempo de proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa (T= L ±1 °C; P= P bar ;Ti3=48 NTU; Ti4= 22,7 NTU).	79
Figura 29. Comportamiento del flujo de permeado y del FRV con respecto al tiempo durante la MFT en modo alimentación-extracción (T= L±2°C; P=P±0,1 bar; Ti1=22,9 NTU; Ti2= 23,4 NTU).	81
Figura 30. Muestras de agua de pipa (a) comercializada actualmente por la empresa (b) microfiltrada.	85

Nomenclatura

FAO	Food and Agriculture Organization	Ps	Presión de salida
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	T	Temperatura
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos	U	Velocidad tangencial
FDA	Food and Drug Administration	NTU	Unidades nefelométricas de turbidez
PROCOMER	Promotora del Comercio de Costa Rica	At	Área tangencial
UV	Radiación ultra-violeta	UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
MFT	Microfiltración tangencial	Ti	Turbidez inicial
MFT+CUV	Microfiltración tangencial acoplada a cámara con luz UV	NMP/mL	Número más probable por mililitro
°	Grados	PEAD	Polietileno de alta densidad
FRV	Factor de reducción volumétrica	PET	Tereftalato de polietileno
UF	Ultrafiltración	P	Presión
NF	Nanofiltración	Δ E	Medición de cambio de color
OI	Ósmosis inversa	n	número de repeticiones
ED	Electrodialisis	s	desviación estándar
Jp	Flujo de permeado	RTA	Recuento total aerobio
Ptm	Presión transmembranaria	RML	Recuento de mohos y levaduras
Pe	Presión de entrada	E	Estimado

Resumen

Naranjo Ruiz, Sofía

Evaluación del efecto de la microfiltración tangencial sobre las propiedades físico-químicas, características sensoriales y estabilidad microbiológica de agua de pipa (*Cocos nucifera* L.) durante el almacenamiento en refrigeración

Tesis Ingeniería de Alimentos. -San José, C.R.:

S, Naranjo R., 2014.

124 pp.: 30 il. –110 refs.

El objetivo del estudio consistió en evaluar el efecto de la microfiltración tangencial de agua de pipa (*Cocos nucifera* L.) sobre su estabilidad en el tiempo de almacenamiento, con el fin de obtener un aumento en la vida útil del producto. El proyecto surgió debido al interés de una empresa procesadora de frutas por exportar esta bebida. Se estudiaron las propiedades físico-químicas, características sensoriales y estabilidad microbiológica de la bebida utilizando dos métodos de envasado: 1) en la salida de permeado (MFT) y 2) posterior a la microfiltración acoplado a un sistema de llenado con luz UV (MFT+CUV).

Se evaluó la desinfección de los envases de polietileno de alta densidad (PEAD) con ácido peracético a Y ppm determinando la reducción logarítmica de *Escherichia coli*. Se estudió el efecto de la presión transmembranaria (evaluando 5 presiones: M, N, O, P, Q, R y S) sobre el flujo de producto. Se evaluó la aplicación de ácido ascórbico en el agua de pipa, utilizando T ppm y V ppm para la conservación del color.

Se calculó el desempeño del proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa determinando el rendimiento y flujo de permeado mediante ensayos en modo de concentración y en pruebas en modo de alimentación-extracción (ensayos de larga duración). Por último, se comparó la preferencia del agua de pipa obtenida aplicando microfiltración tangencial respecto al agua de pipa procesada actualmente por la empresa, mediante pruebas sensoriales con consumidores del producto.

La desinfección de los envases de PEAD permitió una reducción logarítmica mayor a $6,5 \pm 0,2$ de *Escherichia coli*. La presión transmembranaria más promisoría para la obtención de los mayores flujos de permeado y la menor retención de sólidos solubles en el proceso resultó de P bar. La concentración de V ppm de ácido ascórbico resultó efectiva para la conservación del color del producto.

Los flujos de permeado al realizar ensayos en modo concentración presentaron gran variabilidad debido a la turbidez inicial del producto; sin embargo, los valores obtenidos fueron aptos para escalar el proceso a nivel industrial, obteniendo rendimientos altos. Los ensayos de larga duración permitieron demostrar que al alcanzar un FRV de 15, los flujos de permeado del agua de pipa se logran mantener constantes y por encima de $50 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$, obteniendo un rendimiento cercano a 93%.

La aplicación de un método de envasado utilizando la cámara con luz UV no permitió obtener una bebida con estabilidad adecuada para su comercialización, debido a una recontaminación microbiana. El agua de pipa envasada directamente en la salida del permeado, presentó características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas para la comercialización del producto hasta el día 28 de almacenamiento en refrigeración, muy superior a la vida útil asociada al proceso actualmente aplicado por la empresa. Por último, se determinó que el consumidor posee preferencia por el producto actualmente comercializado, respecto al obtenido mediante MFT, por lo que la empresa debe establecer una nueva estrategia de mercadeo en el caso de implementar la nueva tecnología desarrollada para el procesamiento de agua de pipa.

MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL; AGUA DE PIPA; ESTUDIO DE ALMACENAMIENTO.

Lic. Marvin Soto Retana, Director del Proyecto

Escuela de Tecnología de Alimentos

1 JUSTIFICACIÓN

La planta de coco pertenece a la familia *Arecaceae*, su nombre científico es *Cocos nucifera* L., es una palmera de tronco largo y elástico, con hojas en la copa. El fruto de esta palma es el coco, una drupa cubierta con una capa gruesa y fibrosa. En el interior del fruto se encuentra una capa dura llamada nuez de coco, dentro de ella se ubica la semilla, compuesta por una pulpa blanca comestible, y un líquido blanquecino, conocido como agua de pipa o coco; esta bebida es dulce, hidratante y posee alto contenido mineral y vitamínico (Punchihewa & Arancon, 1999; Ovalles *et al.*, 2002; Debmandal & Mandal, 2011; Prades *et al.*, 2012).

Gracias a lo común que es el agua de pipa en la zona tropical, ésta es muy consumida en dicha región, siendo buscada principalmente en épocas secas, cuando el calor agobia, debido a su capacidad refrescante. Diferentes estudios han demostrado que Filipinas e Indonesia son los mayores productores de coco, seguidos de India. Otras zonas con alta siembra de este fruto son Sri Lanka, Tailandia, México y Brasil. Cabe destacar que este último país es uno de los mercados más desarrollados para el agua de coco, donde las ventas del producto embotellado se duplicaron del año 2000 al 2006 (MAG, 2001; González, 2006; Matsui *et al.*, 2007; Rolle, 2007; Debmandal & Mandal, 2011; Igutii *et al.*, 2011; Prades *et al.*, 2012).

El agua de pipa no sólo es una bebida tropical, sino que también posee múltiples usos, tales como: aplicaciones en medicina tradicional, medio de cultivo microbiológico, procesamiento de vinagre, catalítico en laboratorios bioquímicos y bebida para deportistas. En algunos países asiáticos el agua de pipa es considerada como un símbolo religioso. Además, ésta fue empleada en la Segunda Guerra Mundial como sustituto de suero glucosado por su capacidad isotónica natural, es decir, posee un equilibrio electrolítico semejante al de la sangre del ser humano (FAO, 1998; MAG, 2001; Ovalles *et al.*, 2002; Debmandal & Mandal, 2011; Igutii *et al.*, 2011; Prades *et al.*, 2012).

Nutricionalmente, esta bebida se caracteriza por contener principalmente agua, azúcares solubles, proteínas, sales y una pequeña cantidad de aceite. Los azúcares solubles son la mayor fracción sólida, seguido de los minerales; estos últimos representan del 0,4 al 1% del volumen del líquido y contribuyen a las propiedades isotónicas. La bebida posee también cantidades

considerables de vitaminas del complejo B y vitamina C (MAG, 2001; Valenzuela & Meléndez, 2004; FAO, 2007; Debmandal & Mandal, 2011; Prades *et al.*, 2012).

Debido a las propiedades nutricionales, curativas y refrescantes del agua de pipa, ésta posee una alta demanda en el mercado tanto nacional como internacional. Durante los últimos años se ha incrementado el consumo de productos naturales que brinden beneficios extras a la salud de los compradores. Según la Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER) las exportaciones de coco fresco durante el año 2013, hasta el mes de noviembre, alcanzaron valores de \$218 000, sin embargo, se considera que el procesamiento de coco fresco a nivel nacional y la venta de productos derivados tanto en nuestro país como en el exterior, pueden generar mayor cantidad de beneficios económicos; uno de estos productos sería el agua de pipa (Méndez, 2001; González, 2006; PROCOMER, 2014a).

La producción y comercialización a nivel industrial de esta bebida presenta varios inconvenientes principalmente por la vida útil tan corta que posee. Se considera que en muchos países, como en Costa Rica, no se ha logrado establecer una tecnología adecuada para la preservación de este jugo. Una de las razones de la disminución de la vida útil del agua de pipa, es la generación de coloraciones indeseables, las cuales provocan el rechazo del consumidor y la disminución de las propiedades nutricionales (Ovalles *et al.*, 2002; FAO, 2007; Matsui *et al.*, 2008; Prades *et al.*, 2012).

La FAO ha propuesto una metodología en la que se realizan macro y microfiltraciones para aumentar la vida útil del agua de pipa. En la microfiltración tangencial se utilizan membranas por las cuales pasa el producto gracias a la aplicación de presión, y retiene componentes celulares grandes y contaminantes microbiológicos: patógenos, microorganismos de deterioro y esporas. Este proceso permite que compuestos de menor tamaño como azúcares, agua y diversos solutos atraviesen la membrana. Las membranas utilizadas poseen una estructura microporosa permitiendo separar las partículas finas, de un tamaño entre 0,02 y 20 μm . Con una selección del tamaño adecuado de la membrana se logra entonces reducir de manera importante la carga microbiológica, con el mínimo cambio en los nutrientes y funcionalidad, representando una ventaja sobre los tratamientos térmicos convencionales (Ovalles *et al.*, 2002; Chaverri, 2003; Moler, 2004; FAO, 2007; Soto, 2010; Valverde, 2011).

Debido a que la microfiltración disminuye la carga microbiológica de los alimentos es importante, posterior a este tratamiento, mantener condiciones limpias y asépticas para evitar recontaminaciones en el producto. Después de microfiltrar el agua de pipa, se almacena en recipientes, por tanto, éstos también deben encontrarse libres de agentes contaminantes. Una manera de generar un ambiente limpio y evitar contaminaciones es la aplicación de luz ultravioleta (UV-C) en la etapa de llenado, pudiendo resultar una buena opción en este caso. La luz ultravioleta es aplicada para la desinfección en medios líquidos, aire y superficies; esta radiación induce cambios bioquímicos en el ácido nucleico y proteínas generando inactivación microbiana (Lim & Blatchley, 2009; Falguera *et al.*, 2011).

La luz ultravioleta (UV-C) también ha sido aplicada en contacto directo con alimentos como una tecnología emergente con el fin de evitar tratamientos térmicos y a la vez permitir mayor conservación de compuestos bioactivos, los cuales brindan beneficios a la salud de los consumidores. Se ha comprobado que una dosis adecuada de esta radiación ayuda a la inactivación microbiana en alimentos permitiendo obtener periodos de vida útil más prolongados (Falguera *et al.*, 2011; Pala & Toklucu, 2011; Corrales *et al.*, 2012).

Otros aspectos importantes al aplicar microfiltración y envasado con luz UV-C en el agua de pipa es determinar si se generan cambios perjudiciales en las propiedades físico-químicas y sensoriales del producto final. Además, el empaque y las condiciones de almacenamiento afectan la calidad de la bebida. El agua de pipa conserva sus propiedades cuando se mantiene a bajas temperaturas (0 a 4°C). En el mercado se adquiere esta bebida en diferentes empaques desde el propio coco con corteza hasta latas, envases *tetra-brik* y botellas plásticas con distinta composición de polímeros (Aguilera *et al.*, 2001; Ovalles *et al.*, 2002; Lim & Blatchley, 2009; Cisse *et al.*, 2011; Flores, 2012).

Para nuestro país, la aplicación de procedimientos y operaciones que logren mantener la calidad y estabilidad del agua de pipa es algo novedoso y representa un reto. Además, otras zonas han logrado adelantarse en este campo, por lo tanto, se considera importante establecer procesos alternativos para aumentar la vida útil del agua de pipa nacional con el fin de comercializarla tanto en nuestro país como en el exterior (Ovalles *et al.*, 2002; Lim & Blatchley, 2009; Cisse *et al.*, 2011).

La importancia de conocer la vida útil de un alimento procesado puede enfocarse tanto desde el punto de vista del consumidor, como desde el punto de vista del fabricante. Para el consumidor,

el tiempo de vida útil debe garantizar un nivel aceptable en la calidad del alimento al momento de su consumo. Para el fabricante constituye una manera de garantizar la satisfacción del consumidor por el producto y de minimizar la incidencia de quejas relacionadas con la calidad del mismo (Anzueto, 1991; Tso, 2010).

El Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) realizó estudios previos con el agua de pipa producida por una empresa nacional, los cuales revelaron que la vida útil del producto al aplicar microfiltración tangencial y pasteurización es de 15 días. Este tiempo no es suficiente para comercializar el agua de pipa en el exterior del país, lo cual es interés de la empresa. Por consiguiente se pretende buscar un proceso que permita mantener el producto con la calidad requerida por más tiempo. Además, se evidenció la posibilidad de recontaminación en el almacenamiento debido a los recipientes o botellas que contienen el producto final. Una manera de evitar este problema sería aplicar una etapa de desinfección, por lo que es necesario determinar las condiciones requeridas (Soto *et al.*, 2012).

Debido a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue aumentar la vida útil del agua de pipa en una empresa que procesadora de frutas y vegetales, mediante la incorporación de la operación de microfiltración tangencial y llenado en una cámara donde se aplica luz ultravioleta para su desinfección. Además, se evaluó el efecto de estas operaciones sobre las propiedades físico-químicas, microbiológicas y las características sensoriales del producto. Para esto se determinó, a escala piloto, las condiciones adecuadas para la operación de microfiltración y de la cámara de llenado con luz ultravioleta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la microfiltración tangencial acoplada a un sistema de llenado utilizando luz UV, sobre las propiedades físico-químicas, características sensoriales y estabilidad microbiológica de agua de pipa (*Cocos nucifera* L.) durante el almacenamiento en refrigeración.

2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto del método de llenado (microfiltración y microfiltración acoplada al sistema de llenado con luz UV) sobre las propiedades físico-químicas, características sensoriales y estabilidad microbiológica del agua de pipa durante el almacenamiento.
2. Evaluar el desempeño del proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa determinando el rendimiento y flujo de permeado óptimos.
3. Estudiar el desempeño del proceso de microfiltración tangencial con respecto al flujo de permeado y factor de reducción volumétrica (FRV) óptimo mediante ensayos de larga duración.
4. Comparar la preferencia del agua de pipa obtenida aplicando microfiltración tangencial respecto al agua de pipa procesada actualmente por la empresa mediante pruebas sensoriales con consumidores.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de la planta de coco

El cocotero o planta de coco es la palmera más cultivada del mundo, ampliamente distribuida alrededor de Asia, África, Latinoamérica y la región pacífica. Es una planta sin ramas, de tronco recto o curvo, largo y elástico. La palmera presenta un sistema radicular fasciculado, es decir, las raíces primarias son encargadas del sostén de la planta y la absorción de agua, mientras que las raíces terciarias extraen los nutrientes. Posee hojas pinnadas ubicadas solamente en la copa de la palma (Ovalles *et al.*, 2002; Valenzuela & Meléndez, 2004; Hammer, 2012). En la **Figura 1** se muestra la planta de coco. Su clasificación botánica se indica en el Cuadro I.



Figura 1. Planta de coco.

Cuadro I. Clasificación botánica de la planta de coco.

Clase	Monocotyledoneae
Orden	Palmales
Familia	Areceaceae
Subfamilia	cocovsideae
Género	Cocos
Especie	nucifera

Fuente: Valenzuela & Meléndez (2004); Debmandal & Mandal (2011).

El fruto del cocotero es el coco, una drupa cubierta por tejido fibroso, constituido por el exocarpo y mesocarpo. En el interior del fruto se encuentra el endocarpo, formado por una capa dura llamada nuez de coco, dentro de ella se ubica la semilla, compuesta por una pulpa blanca comestible, y un líquido blanquecino, conocido como agua de pipa o coco. El embrión se ubica en el endospermo (Ovalles *et al.*, 2002; Valenzuela & Meléndez, 2004; de León & Delores, 2005). La estructura del fruto se muestra en la **Figura 2**.

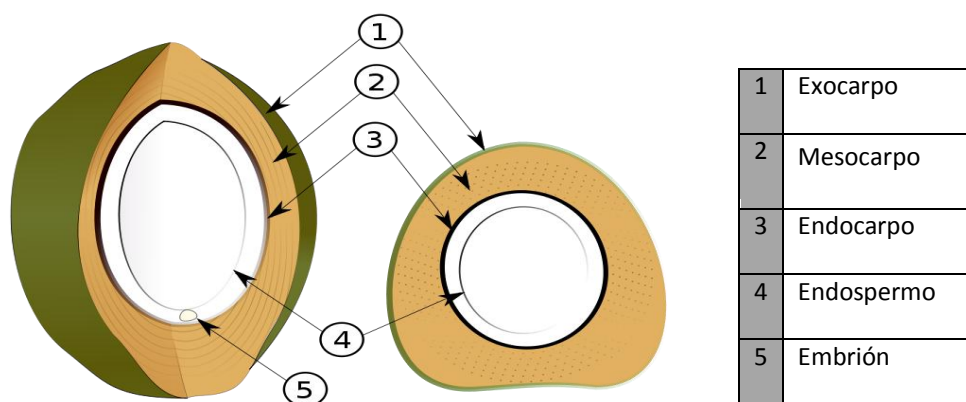


Figura 2. Fruto del coco (adaptado de Hammer, 2012).

De este árbol se obtienen diversos productos con alto valor económico en el mercado mundial: aceite de coco, coco deshidratado, coco fresco, leche de coco, copra, carbón activado, cosméticos, fibras y agua de coco. Hoy en día, es una de las principales especies productoras de grasa vegetal (Ovalles *et al.*, 2002; Universidad de Chapingo, 2002; Valenzuela & Meléndez, 2004; de León & Delores, 2005; Debmandal & Mandal, 2011; Prades *et al.*, 2012).

3.1.1 Producción mundial de coco

En los últimos años el cultivo mundial de la planta de coco ha aumentado. Existen múltiples países productores de coco, sin embargo, los países asiáticos lideran la oferta mundial. En la actualidad Indonesia es el principal productor, seguido de Filipinas e India (Debmandal & Mandal, 2011). Para el año 2001 estos tres países representaban el 72,8% de la producción mundial de coco. No obstante, otras zonas asiáticas como Tailandia y Sri Lanka, y países americanos, como

Brasil y México son también importantes productores del fruto (IICA, 2001; de León & Delores, 2005; González, 2005). En la **Figura 3** se muestran datos estadísticos sobre la producción mundial de coco.

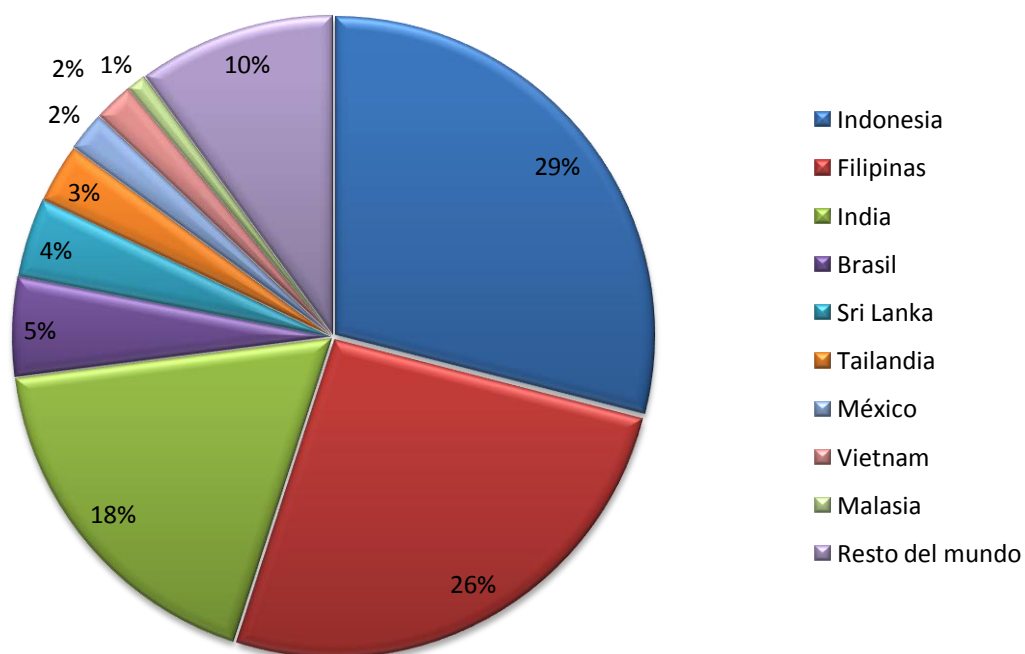


Figura 3. Producción mundial de coco (adaptado de González, 2005).

3.1.2 Producción de coco en Costa Rica

La mayor producción de coco en Costa Rica se presenta en la Zona Atlántica. Otras zonas de producción importantes son San Carlos, y el Pacífico Central y Sur. En el país se ha presentado una problemática en los últimos años respecto a la actividad cocotera, ya que los rendimientos han disminuido en algunas plantaciones.

Lo anterior no ha permitido el aprovechamiento del potencial productivo del coco, lo que ha causado disminución en los ingresos del productor y desmejora del nivel socioeconómico, a la vez se han percibido menor cantidad de divisas por concepto de exportación, tanto de subproductos como de coco fresco (Barcía, 2007).

3.2 Generalidades del agua de pipa

El agua de coco es una bebida dulce y refrescante obtenida del interior del coco. No se debe confundir con la leche de coco que es un líquido blanco obtenido al rallar el núcleo fresco del coco. Cabe destacar que en Costa Rica, el coco verde es conocido como pipa y el agua obtenida de su interior es considerada una bebida tradicional en las zonas costeras e identificada como una bebida exótica en muchos países (Ovalles *et al.*, 2002; Valenzuela & Meléndez, 2004; Prades *et al.*, 2012).

Esta bebida ha sido utilizada desde hace mucho tiempo atrás, fue empleada en la Segunda Guerra Mundial como sustituto de suero glucosado por su capacidad isotónica natural, es decir, posee un equilibrio electrolítico semejante al de la sangre del ser humano. Los electrolitos en agua, en soluciones isotónicas son más rápidamente absorbidos, permitiendo la recuperación de nutrientes más fácilmente. El agua del coco es comercialmente la única bebida isotónica natural disponible (Valenzuela & Meléndez, 2004; Prades *et al.*, 2012).

El agua de coco es también valorada debido a sus múltiples usos, tales como: aplicaciones en la medicina tradicional, medio de cultivo microbiológico, procesamiento de vinagre, catalítico en laboratorios bioquímicos y bebida para deportistas. En algunas naciones asiáticas el agua de pipa es considerada como un símbolo religioso (FAO, 1998; MAG, 2001; Ovalles *et al.*, 2002; Debmandal & Mandal, 2011; Iguitii *et al.*, 2011; Prades *et al.*, 2012).

La popularidad de la bebida ha aumentado en los últimos años debido a sus propiedades nutricionales y su bajo contenido calórico que la clasifican como un alimento funcional. Se ha demostrado que 100 mL de la bebida contienen cerca de 20 calorías. Las propiedades nutricionales del agua de coco se muestran en el Cuadro II (Prades *et al.*, 2012)

Cuadro II. Propiedades nutricionales promedio reportadas para el agua de pipa (tamaño de porción = 100 mL).

Componente	Cantidad
Carbohidratos (g)	2,7
Proteínas (g)	0,25
Lípidos (g)	0,51
Cenizas (g)	0,43
Potasio (mg)	259,00
Cloro (mg)	119,50
Azufre (mg)	42,00
Calcio (mg)	31,58
Sodio (mg)	28,88
Magnesio (mg)	11,56
Aluminio (mg)	0,06
Zinc (mg)	0,04

Fuente: Prades *et al.* (2012).

La fruta del coco tarda de 11 a 12 meses para alcanzar su mayor madurez. A los 5 meses el núcleo empieza a formar una capa gelatinosa alrededor de la parte interna del endocarpio, en este momento el agua del coco se encuentra bajo presión. Durante la maduración, se libera la presión y el agua es remplazada por el núcleo (ver **Figura 4**). Poco a poco, el núcleo crece y al alcanzar 12 meses el agua de coco representa del 15 al 30% del peso de la nuez, y la cantidad de agua extraída puede variar desde 133-524 mL/ coco. El contenido de azúcar aumenta gradualmente durante la maduración, llegando a su cantidad máxima a los 9 meses (Valenzuela & Meléndez, 2004; Prades *et al.*, 2012).

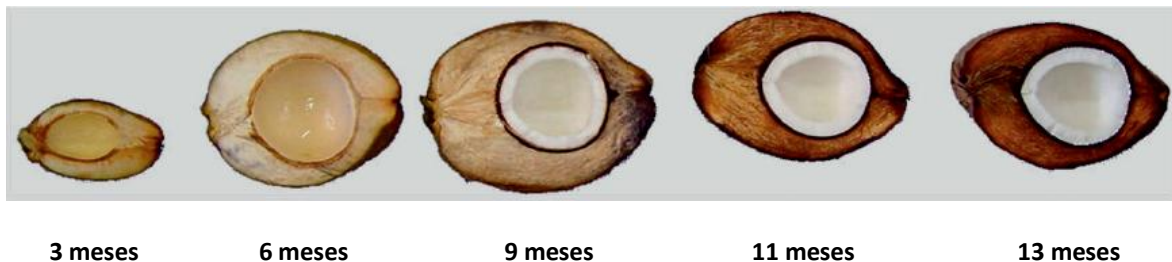


Figura 4. Crecimiento de la fruta del coco (Adaptado de Prades *et al.*, 2012).

Debido a lo anterior, las propiedades físico-químicas y sensoriales del agua de pipa pueden variar según su estado de madurez y según la variedad de coco. Prades *et al.* (2012) recopilaron datos de diversas variedades de agua de coco del mundo, reportando un valor promedio de pH de 5,5; y azúcares totales promedio de 2,7 g/100mL, siendo los azúcares la principal fracción de sólidos solubles contenidos en esta bebida. Los principales son sacarosa, sorbitol, glucosa y fructosa, seguido de la galactosa, xilosa y manosa.

Los minerales son el segundo componente en términos de cantidad, el potasio y el cloro son los principales presentes, como se observa en el Cuadro II. Además de los azúcares, minerales y proteínas, el agua de pipa contiene una fracción minoritaria de compuestos volátiles que generan un sabor y aroma característico del producto. Entre ellos se encuentra el nonanal, nonanol, heptanal, heptanol, etiloctanoato y 2-nonanol. Se han identificado también ácidos orgánicos destacando los siguientes: málico, succínico, cítrico, acético y tartárico (Ovalles *et al.* 2002; Prades *et al.*, 2012).

El agua de pipa presenta también aminoácidos; conteniendo alanina, arginina, cisteína y serina en mayor proporción que la presente en la leche de vaca. Otras moléculas de naturaleza proteica, que posee la bebida, son las enzimas. Éstas han sido ampliamente estudiadas por diversos autores, ya que son responsables de coloraciones amarillas, café y rosadas en el producto (Ovalles *et al.*, 2002; Prades *et al.*, 2012).

Se ha identificado actividad enzimática de peroxidasa y polifenoloxidasa en agua de pipa almacenada a -20 °C de 0,3 y 5,0 U/mL, respectivamente. La actividad óptima de estas enzimas se presenta en condiciones de pH de 5,5-6,0 y a temperaturas de 25-35 °C. Lo anterior justifica la necesidad de mantener la bebida en refrigeración para su mejor mantenimiento (Prades *et al.*, 2012).

Debido a la presencia de enzimas en el agua de pipa, se ha estudiado el uso de sustancias que disminuyan esta actividad. La más utilizada es el ácido ascórbico, debido a que es un fuerte antioxidante y se ha comprobado su acción efectiva para la inhibición de polifenoloxidasa y peroxidasa, principales enzimas en el agua de pipa. Distintos autores recomiendan utilizar ácido ascórbico, pues incrementa a la vez el contenido de vitamina C en el jugo y no es un preservante químico que pueda ser rechazado por las tendencias actuales de los consumidores (Ovalles *et al.*, 2002; Hernández, 2009; Prades *et al.*, 2012).

3.2.1 Industrialización y comercialización de agua de pipa

El agua de pipa es un producto muy susceptible al ataque microbiano lo que provoca su rápido deterioro, representando un reto para su industrialización y comercialización. Se han realizado múltiples estudios a nivel mundial en búsqueda de metodologías que permitan la conservación de la bebida, debido a su alta demanda. Según PROCOMER (2012 b) se considera de gran importancia aprovechar los frutos de cocos nacionales, pues el mercado del agua de coco en la Unión Europea tiene un valor creciente para los próximos años aún sin realizar un trabajo de publicidad y marketing intenso.

Industrias internacionales, en países como Indonesia, Filipinas y Tailandia realizan procesos de pasteurización aplicando alta temperatura en cortos tiempos (HTST por sus siglas en inglés) en agua de coco para aumentar su vida útil; al ser tiempos tan cortos, no se presentan cambios importantes en el color. No obstante, esta operación causa pérdidas del valor nutricional y el sabor natural. Otra tecnología que se ha implementado es la carbonatación con la desventaja de generación de cambios en el sabor típico del producto (Ovalles *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2005).

Algunos autores mencionan que la FAO ha encontrado una metodología capaz de solucionar los problemas anteriores, la cual consiste en esterilizar en frío utilizando tanto macrofiltraciones como microfiltraciones y se envasa empleando nitrógeno con la finalidad de evitar la incorporación de oxígeno, molécula que favorece la actividad enzimática. De esta manera se ha logrado alcanzar una vida útil cercana a 8 meses, sin embargo, la metodología no se ha divulgado públicamente (Ovalles *et al.*, 2002; Das Purkayastha *et al.*, 2012).

3.2.2 Parámetros de calidad del agua de pipa

La FAO ha establecido una serie de regulaciones de calidad para el agua de pipa embotellada, con el fin de mantener las características propias del producto y brindar un producto inocuo a los consumidores. De acuerdo con el Departamento de Agricultura de Estado Unidos (USDA), la microfiltración tangencial es un proceso que puede remover una mayor cantidad de microorganismos patógenos que la pasteurización (procedimiento térmico convencional). Sin embargo, la vida útil de los productos suele aumentarse cuando se aplican ambos procesos, la microfiltración y la pasteurización (Rolle, 2007; USDA, 2009).

Además, de acuerdo con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08), se deben cumplir criterios microbiológicos para bebidas. Debido a lo anteriormente mencionado, se considera que el agua de pipa microfiltrada, según el Reglamento Técnico Centroamericano, pertenece a la categoría de jugos pasteurizados. En el Cuadro III se muestran los parámetros de calidad indicados para agua de pipa (COMEX *et al.*, 2008).

Cuadro III. Parámetros de calidad establecidos para agua de pipa.

Parámetro	Límites
Sólidos solubles (°Brix)	5,0-6,5 ° ^a
Recuento total aerobio (UFC/mL)	^a
<i>E. coli</i>	< 3 NMP/mL ^b

Fuente: a: Rolle (2007). b: COMEX *et al.* (2008)

El recuento de microorganismos aerobios totales en agua de pipa está relacionado con el buen estado del producto, mientras que el conteo de coliformes indica el grado de higiene en el proceso y envasado. Los coliformes fecales son potencialmente dañinos para el consumidor por lo que no son tolerables en el agua de coco. Las levaduras son también organismos que fácilmente atacan la bebida durante el envasado por lo que es importante controlar su presencia (Rolle, 2007).

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera un microorganismo de flora normal, pero existen cepas patógenas capaces de causar daño a los consumidores, podría causar desde diarrea hasta la muerte. Dado lo anterior, el Reglamento Técnico Centroamericano especifica el límite permitido de esta bacteria, como se muestra en el Cuadro III (Rodríguez, 2002).

Además de los parámetros anteriores, se considera esencial contar con otros controles, como la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura durante la cosecha, manipulación posterior a la recolección, lavado, proceso, envasado y almacenamiento, para mantener la calidad e inocuidad del agua de pipa. Diferentes estudios demuestran que el agua de coco debe enfriarse de manera inmediata a su procesamiento y mantenerse a temperaturas de 0 a 4 °C durante el almacenamiento, con el fin de retrasar el inicio del proceso de deterioro. Se debe tomar en cuenta

también la desinfección de los instrumentos en contacto con el agua de coco, así como las botellas y tapas, de lo contrario representarían un riesgo para el estado de conservación del producto (Rolle, 2007).

Los aspectos sensoriales del producto son determinantes en su vida útil del mismo. En este caso, en el agua de pipa se pueden presentar gases y olores a azufre producto de la fermentación que se lleva a cabo gracias a la presencia de microorganismos. Otro aspecto importante en la calidad de la bebida es el color, naturalmente el agua de coco es incolora, y de aspecto claro. Los cambios en la coloración se presentan debido a la actividad enzimática (Rolle, 2007).

3.3 Tecnologías de membranas

Durante años se han utilizado operaciones para realizar separaciones o purificaciones basándose en las propiedades químicas o físicas de los componentes de la mezcla a separar, como densidad, color, solubilidad, carga eléctrica, forma, tamaño, entre otros. Algunas de las operaciones convencionales utilizadas para lograr este objetivo son: evaporación, cristalización, sedimentación, secado, centrifugación y decantación. Estos procesos suelen incluir la adición o eliminación de calor o pre-tratamientos que alteran los componentes de la mezcla de interés (Walstra, 2005; Muthukumarappan & Marella, 2010).

Las tecnologías de membranas son tecnologías emergentes que poseen ventajas respecto a los métodos convencionales. Desde su invención, se han convertido en una herramienta valiosa para la separación de mezclas de componentes, siendo actualmente utilizadas en la industria farmacéutica, química, alimentaria y biotecnológica. Se caracterizan por ser procesos con bajos requerimientos energéticos que pueden ser fácilmente adaptables a otros procesos de separación; el proceso se logra realizar a temperatura ambiente y no se presentan alteraciones químicas en el producto. Se ha demostrado que la filtración por membranas posee un potencial de ahorro del 30-50 % de la energía utilizada por evaporación y destilación. Los equipos que trabajan con membranas son compactos por lo que requieren poco espacio. A pesar de los beneficios anteriores, la utilización de tecnologías de membranas posee inconvenientes, destacando la colmatación de la membrana, que representa procesos minuciosos de lavado. Además, el uso de membranas representa cuidados esenciales con las membranas, con el fin de evitar daños o rupturas (Wang, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010; Soto, 2010).

Las tecnologías de membranas funcionan permitiendo el paso de ciertos componentes que forman el flujo denominado “permeado”; por otra parte los componentes que no logran atravesar la membrana forman parte del flujo conocido como “retenido”. Estas tecnologías se basan en separaciones por tamaño de partícula; se realiza la alimentación del producto, dado que éste es impulsado por fuerzas motrices para atravesar la membrana, por lo que estos procesos son utilizados para concentrar partículas, purificar o esterilizar fluidos. La leche y los jugos de frutas son los principales alimentos en los que se han utilizado estas tecnologías (Walstra, 2005; Wang, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010; Rai & Sirshendu, 2011).

Las filtraciones pueden llevarse a cabo de dos maneras, frontal o de manera transversal, como se muestra en la **Figura 5** (Muthukumarappan & Marella, 2010).

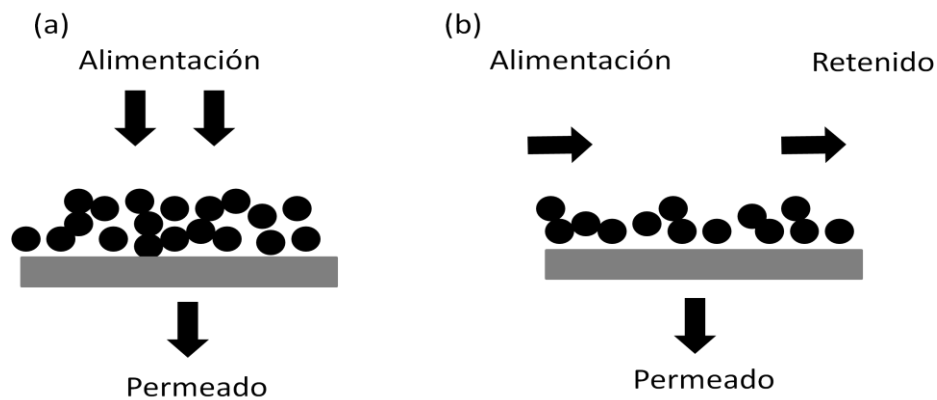


Figura 5. Modelos de operación de separación de membranas. (a) Flujo frontal (b) Flujo transversal (Adaptado de Muthukumarappan & Marella, 2010).

En la filtración frontal la alimentación del producto se realiza de manera perpendicular, generando acumulaciones de retenido difíciles de retirar, causando aumentos en la resistencia de la torta y reducciones drásticas en el flujo. En contraste, en la filtración transversal el producto se bombea tangencialmente o en toda la superficie de la membrana. En este caso la ventaja es que disminuye la acumulación de sólidos en la superficie de la membrana. Este tipo de proceso es utilizado en productos con alta cantidad de sólidos y en procesos a escala industrial (Muthukumarappan & Marella, 2010).

3.3.1 Principales tecnologías de membranas

Existen distintas metodologías en las tecnologías de membranas, las que se emplean según fines específicos; siendo las más utilizadas la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF), ósmosis inversa (OI), evaporación osmótica, pervaporación y electrodiálisis (ED). Las primeras cuatro alternativas trabajan utilizando como fuerza motriz diferenciales de presión, son las más estudiadas hasta la actualidad y sus principales características se resumen el Cuadro IV y en la **Figura 6**. Desde un punto de vista económico, las tecnologías OI, UF, y MF representan más del 60% del mercado mundial de las tecnologías de membranas (Montero, 2008; Wang, 2008, Romero, 2010; Soto, 2010).

Cuadro IV. Características de procesos de tecnologías de membranas que utilizan presión como fuerza motriz.

Tipo de membrana	Tamaño de poro ^(a)	Sustancias retenidas ^(a)	Alternativas de membranas ^(b)
Microfiltración	0,1-10 μm	Bacterias, glóbulos grasos, restos celulares, polisacáridos	Poros capilares, membrana orgánica, membrana inorgánica, membrana de alúmina, membrana de cerámica, membrana de recorrido tortuoso
Ultrafiltración	0,001- 0,01 μm	Macrosolutos: proteínas, péptidos, virus, pirógenos	Polímeros sintéticos, polisulfonas, circonio, óxido, alúmina
Nanofiltración	0,5- 10 nm	Coloides, polisacáridos, azúcares, aminoácidos, proteínas	Delgada película de material compuesto, como poliamida en microporos de polisulfonas
Ósmosis inversa	0,005- 0,001 μm	Iones, azúcares	Polímeros de película delgada asimétrica compuesta

Fuente: (a) Wang (2008); (b) Muthukumarappan & Marella (2010).

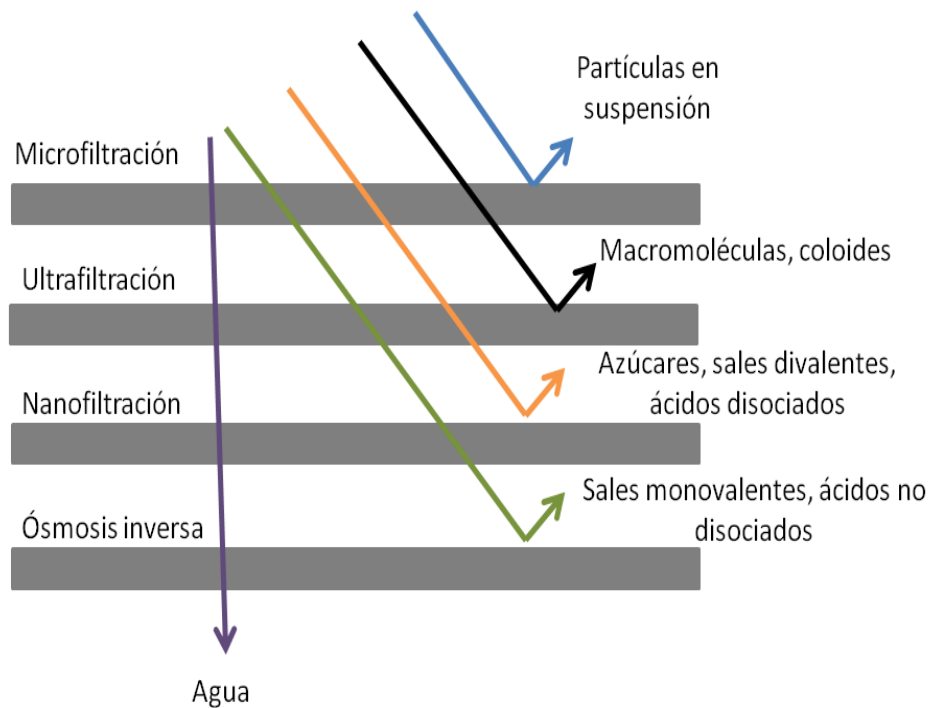


Figura 6. Niveles de separación en los procesos de membranas que utilizan la presión como fuerza motriz (Adaptado de Romero, 2010).

La ultrafiltración emplea presiones altas de hasta 10 bares y su principal aplicación es para el fraccionamiento de la leche, suero y proteínas. La nanofiltración es la técnica intermedia entre ultrafiltración y la ósmosis inversa, siendo aplicada primordialmente en la desalinización del suero lácteo. La microfiltración funciona de manera similar a la ultrafiltración, sin embargo, la presión utilizada es menor (0,5- 3 bar) y se suele aplicar en jugos y para la remoción de grasa. La ósmosis inversa transporta agua desde una solución más concentrada a una más diluida (Montero, 2008; Soto, 2010).

La pervaporación se utiliza para recuperar aromas y para la separación de etanol, funciona debido a la afinidad entre el permeado y el material polimérico utilizado, es decir, un gradiente de concentración. La evaporación osmótica se aplica para la concentración de jugos, trabajando bajo el mismo principio de la pervaporación y permitiendo obtener soluciones altamente concentradas

con bajas presiones y temperaturas. Mientras que la electrodiálisis es un método de separación con potenciales eléctricos, que purifica y concentra iones seleccionados. Es utilizada principalmente para remover sales en agua y alimentos (Walstra, 2005; Montero, 2008; Wang, 2008; Soto, 2010; Rai & Sirshendu, 2011).

3.3.2 Microfiltración de jugos de frutas

Las membranas utilizadas en la microfiltración permiten el paso de micromoléculas mientras que retiene macromoléculas grandes, separa sustancias de acuerdo con su tamaño y solubilidad. La microfiltración en jugos de frutas se ha convertido en un proceso comercial, gracias al avance del desarrollo de nuevas membranas de cerámica, que hacen posible una presión transmembranaria uniforme. La microfiltración de jugos de frutas permite la clarificación y eliminación tanto de bacterias como de esporas, conservando propiedades sensoriales y nutricionales de las materias primas (Walstra, 2005; Wang, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010; Rai & Sirshendu, 2011).

Esta tecnología emergente, permite la clarificación del producto en menores tiempos y obtiene mayores rendimientos comparada con los métodos convencionales. Además no es necesario el uso de auxiliares de filtración y permite adquirir jugos con propiedades consistentes, como sólidos en suspensión, partículas coloidales, proteínas y polifenoles; resultando en la obtención de jugos de mayor calidad (Muthukumarappan & Marella, 2010).

La microfiltración se ha aplicado en diferentes frutas como mora, maracuyá, melón, banano, manzana, sandía, limón, pipa, tamarindo, piña, acerola, naranja, toronja entre otros. Se ha demostrado, que la vida útil de los jugos procesados con MF y UF es muy importante para que sean operaciones exitosas. El mantenimiento del ambiente aséptico durante la filtración y envasado es esencial para contar con una vida útil más larga. Los problemas más comunes durante el almacenamiento son el pardeamiento no enzimático y la pérdida de ácido ascórbico. Usando una cadena de frío durante el proceso y un envasado aséptico, se podría producir jugos comerciales viables (Montero, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010; Romero, 2010; Rai & Sirshendu, 2011).

Varios parámetros influyen en la tasa de deterioro de los jugos, como el crecimiento microbiano, la degradación enzimática, el deterioro químico y los cambios de sabor. Todos estos factores se pueden presentar debido a la higiene durante el empaque, la exposición al oxígeno y la luz, e interacción con el empaque. Por lo tanto, las condiciones de almacenamiento poseen un impacto importante en la calidad y vida útil de los jugos (Rai & Sirshendu, 2011).

3.3.3 Parámetros utilizados en microfiltración tangencial (MFT)

3.3.3.1 Flujo de permeado (J_p)

El flujo a través de la membrana se refiere a la velocidad de permeado, medido como el volumen por unidad de área de la membrana por unidad de tiempo (Muthukumarappan & Marella, 2010).

$$J_p = \frac{\text{Volumen permeado (L)}}{\text{Tiempo (h)} \cdot \text{área (m}^2\text{)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Para que la MFT sea un procedimiento económicamente viable, se ha establecido que es necesario contar con un flujo mínimo de 50 L/ hm² (Vaillant *et al.*, 2004).

3.3.3.2 Factor de reducción volumétrica (FRV)

Es la relación del volumen de alimentación respecto al volumen de retenido obtenido (Ecuación 2). El FRV es una forma de expresar la relación entre el flujo de permeado y el flujo original del alimento; este parámetro se relaciona con el rendimiento del proceso, por lo que debe ser evaluado para conocer la viabilidad del proceso a nivel industrial (Ecuación 3). El FRV por lo general es inversamente proporcional al flujo de permeado, ya que a medida que transcurre el tiempo de proceso se colmata la membrana, contribuyendo al descenso del flujo de permeado (Vaillant *et al.*, 2004; Montero, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010).

$$FRV = \frac{\text{Volumen alimentado (L)}}{\text{Volumen retenido (L)}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Rendimiento} = 1 - \frac{1}{FRV} \quad (\text{Ecuación 3})$$

En procesos industriales se desean operaciones continuas y condiciones de operación constantes. En el caso de la microfiltración tangencial, para mantener el flujo de permeado (J_p) constante se deben mantener las condiciones de proceso y el FRV. Para ello, en ensayos de larga duración, con alimentación continua, se remueve cierta cantidad de retenido (J_r) en intervalos de tiempo establecidos, según la Ecuación 4 (Montero, 2008).

$$J_r = \frac{J_p}{FRV - 1} \quad (\text{Ecuación 4})$$

3.3.3.3 Presión transmembranaria (P_{tm})

La presión transmembranaria es la presión hidrostática neta, responsable de la filtración. Se calcula la diferencia de presión al ingreso y salida de la membrana, y se resta la presión del permeado. La presión del permeado suele tener un valor cercano a cero por lo que es despreciada (Walstra, 2005; Montero, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010).

$$P_{tm} = \frac{P_e - P_s}{2} - P_p \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$$\begin{aligned} P_e &= \text{presión entrada (bar)} \\ P_s &= \text{presión salida (bar)} \\ P_p &= \text{presión permeado (bar)} \end{aligned}$$

3.3.3.4 Temperatura

La temperatura ejerce un efecto sobre la viscosidad. A mayor temperatura menor será la viscosidad y mayor la difusión de la materia a filtrar, por lo que se incrementa el flujo de permeado. Sin embargo, una temperatura alta puede afectar la calidad del producto, favoreciendo la desnaturalización proteica y el crecimiento microbiano (Ortiz *et al.*, 2008; Soto, 2010).

3.3.3.5 Velocidad tangencial (U)

La velocidad tangencial también tiene un efecto sobre el flujo. Al incrementarse la velocidad tangencial, mayor resulta el flujo de permeado, sin embargo, esta variable está limitada por la capacidad de las bombas y el costo energético asociado. Para una membrana tubular la velocidad lineal puede definirse como la relación entre el flujo de alimentación y el área tangencial de la membrana (Ortiz *et al.*, 2008; Soto, 2010).

$$U = \frac{J_{\text{retenido}}}{A_t} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

$$J_{\text{retenido}} = \text{Flujo de retenido} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{s}} \right)$$
$$A_t = \text{área tangencial} (\text{m}^2)$$

3.3.3.6 Turbidez

La turbidez es una medida de la dispersión de la luz en un medio translúcido; esta dispersión causada por la turbidez, genera absorbancia aparente, que es proporcional a la densidad de partículas suspendidas. La turbidez es la medida de la claridad relativa de una muestra, es el parámetro más directo de la concentración de partículas dispersas en una solución (Salas, 2003; Vaillant *et al.*, 2008; Quesada, 2013).

La turbidez de los jugos es un parámetro que debe considerarse durante la microfiltración tangencial, ya que según varios autores, está relacionado con los flujos obtenidos durante el proceso. Los jugos con mayor turbidez generan flujos de permeado y rendimientos menores debido a que las partículas dispersas generan una colmatación más rápida en las membranas (Cancino *et al.*, 2004; Quesada, 2013).

La turbidez además está relacionada con la presencia de partículas con tamaño mayor a 1 μm , que pueden estar conformadas por polisacáridos, coloides, taninos de alto peso molecular, sólidos suspendidos, gomas y microorganismos. La microfiltración permite la remoción de

partículas causantes de turbidez, y se ha establecido que un jugo es clarificado cuando posee una turbidez menor de 5 NTU (Cancino *et al.*, 2004).

La medición de turbidez se utiliza ampliamente en la industria de aguas residuales para controlar la concentración de la materia en suspensión en el lodo. La turbidez de las dispersiones depende principalmente de la forma, el tamaño, y la composición mineral de las partículas. También depende del índice de refracción relativo y, en cierta medida, del color de la fase líquida (Vaillant *et al.*, 2008).

3.4 Sistemas de envasado en jugos

El envasado de jugos cumple con la función de contener, proteger y preservar adecuadamente el producto. El desarrollo de un sistema de empaque eficaz de jugos debe considerar los factores ambientales que pueden afectar el jugo. Por ejemplo, los lípidos y vitaminas pueden oxidarse en presencia de oxígeno. El efecto del envasado en la composición de los jugos durante su vida útil depende de la tecnología utilizada y de las condiciones del almacenamiento. Existen diversas tecnologías de empaque que se aplican en la actualidad, es importante seleccionar el procedimiento de envasado de acuerdo con los requerimientos del producto, pues para algunos alimentos puede resultar más conveniente una tecnología determinada (Desêches, 2006; Liu & Floros, 2012).

Las zonas de envasado deben contar con ambientes asépticos, en los cuales se deben realizar preesterilizaciones y se utilizan filtros de aire de alta eficiencia (HEPA) o flujos de aire laminar. De esta manera se busca que sea una zona pasiva (estéril) o activa (no estéril) que evite la recontaminación del producto. Los vectores de recontaminación incluyen fallas de filtro, crecimiento microbiano y la aspiración de aire no estéril de la zona de trabajo debido a la pérdida de laminaridad (Desêches, 2006; Jairus *et al.*, 2012).

En el caso de frutas y jugos de frutas el factor principal a considerar durante el envasado es el peligro de recontaminación con microorganismos posterior al procedimiento para la eliminación de los mismos, ya sea mediante un tratamiento térmico o una tecnología emergente. Otro aspecto esencial es la pérdida de vitaminas, minerales o compuestos bioactivos como flavonoides o prostaglandinas presentes en el producto. Se debe considerar también parámetros del producto

tales como la actividad del agua, sensibilidad a la luz, cargas microbianas y procesos de oxidación. Existen diferentes sistemas para la realización de empaques asépticos, que han sido utilizados desde hace varias décadas atrás en la industria de alimentos (Desêches, 2006).

Las metodologías de envasado más comunes se relacionan con la aplicación de esterilizaciones posteriores al envasado, utilizando altas temperaturas. En el caso de jugos microfiltrados no se considera una buena opción, pues la idea de esta tecnología emergente es no aplicar altas temperaturas para la conservación de nutrientes, por lo que se deben buscar otras alternativas de empaque (Desêches, 2006).

Se han aplicado y estudiado el uso de atmósferas modificadas y aplicación de radiación UV en los ambientes de envasado. En ambos casos, es necesaria la realización del llenado en una zona de procesamiento con ambiente controlado. El funcionamiento de estas metodologías se detalla a continuación (Desêches, 2006).

3.4.1 Aplicación de radiación Ultravioleta (UV -C)

La aplicación de radiación UV se ha establecido para el tratamiento de aguas, en alimentos y desinfección del aire y superficies. Desde hace años atrás se ha utilizado la luz UV para la desinfección de salas y ambientes controlados. Los recientes avances en la ciencia y la ingeniería de la irradiación con luz UV han demostrado que es un tratamiento muy prometedor en el procesamiento de alimentos como una alternativa a los procesamientos térmicos en alimentos líquidos como zumos naturales, refrescos y bebidas, pues en la mayoría de los casos no genera cambios en la calidad nutricional y sensorial de los jugos, además ayuda a la extensión de la vida útil. Sin embargo, no es tan recomendado en alimentos viscosos o sólidos por su falta de penetración (Koutchma *et al.*, 2009; Caminiti *et al.*, 2011; Falguera *et al.*, 2011; Uysal & Kirca, 2011; Corrales *et al.*, 2012).

Diferentes estudios han demostrado una disminución de la actividad enzimática en jugos de frutas al aplicar esta tecnología. Enzimas como polifenoloxidasas (PPO), ATPasa y ácido fosfatasa se pueden desnaturalizar al aplicar esta radiación, lo que constituye la disminución de la actividad enzimática. Se ha logrado una disminución del 75% de la actividad enzimática de la PPO, y hasta un 50% de las otras dos enzimas. Otros autores han logrado la inactivación completa de la PPO en

jugo de manzana, aplicando radiaciones por largos tiempos y altas potencias (100 minutos, 400 W) (Falguera *et al.*, 2011). Considerando la presencia de enzimas en el agua de pipa, se considera que la aplicación de luz UV-C podría ser un tratamiento promisorio.

Para la aplicación de esta tecnología, es importante conocer los tiempos de uso, y la potencia de la lámpara. La luz UV es sólo una porción del espectro de ondas electromagnéticas diferentes que viajan a través del espacio. El espectro electromagnético cubre un amplio espectro de longitudes de onda. Típicamente, las longitudes de onda para el uso de radiación UV se encuentran entre los rangos de 100- 400 nm (Ver **Figura 7**). Este rango puede subdividirse en UV-A (315-400 nm), normalmente responsables de cambios en la piel humana; UV-B (280-315 nm), que puede causar ardor en la piel y eventualmente llevar a cáncer de piel, UV-C (200-280 nm), llamado el rango germicida, ya que, efectivamente inactiva bacterias y los virus, y el rango de vacío UV (100-200 nm), radiación que puede ser absorbida por casi todas las sustancias y por lo tanto sólo puede transmitirse en el vacío (Koutchma *et al.*, 2009; Uysal & Kirca, 2011; Corrales *et al.*, 2012; Falguera *et al.*, 2011).

Cuando los fotones UV-C chocan con átomos de oxígeno, el intercambio de energía provoca la formación de ozono. La radiación UV-C casi nunca se observa en la naturaleza, ya que se absorbe muy rápidamente (Koutchma *et al.*, 2009).

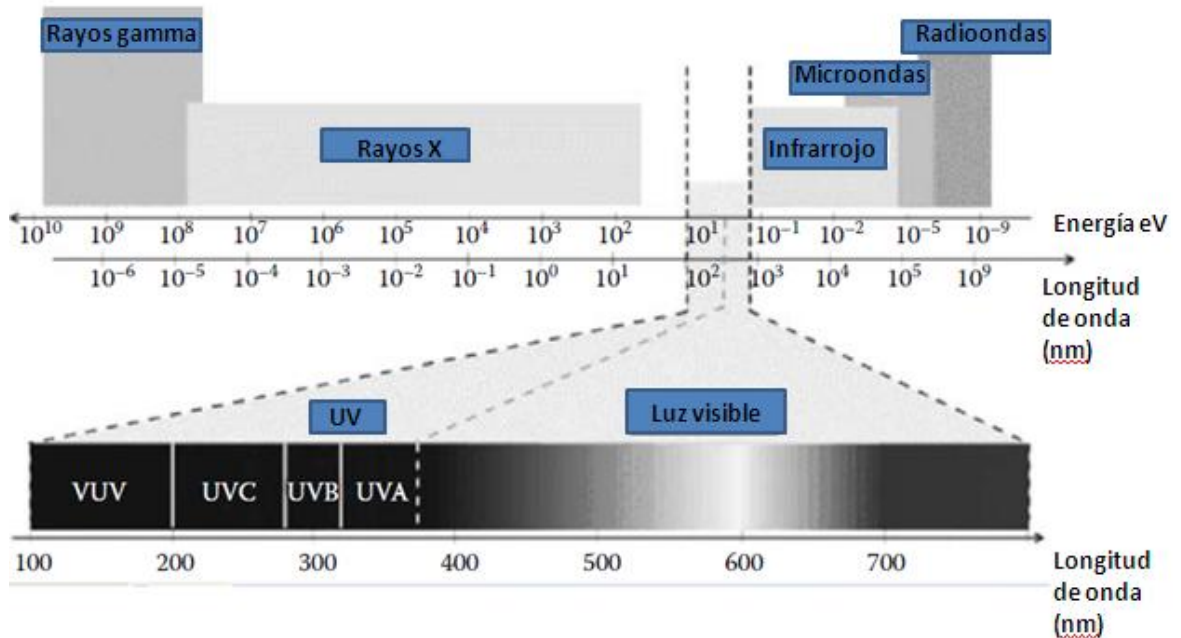


Figura 7. Espectro de radiación electromagnética (Adaptado de Koutchma *et al.*, 2009).

La luz UV emitida por los átomos e iones dentro de la descarga de gas de las lámparas UV, se propaga alejándose de estos átomos e iones, por lo que la luz se propaga interactuando con los materiales mediante refracción, reflexión, absorción y dispersión (Koutchma *et al.*, 2009).

La evaluación de la energía de radiación aplicada al utilizar luz UV debe ser cuantificada. Comúnmente es medida considerando la energía incidente por unidad de área. La velocidad de fluencia o de irradiación (E') es la potencia radiante total incidente desde todas las direcciones sobre una esfera infinitamente pequeña de área transversal dA , por lo que su unidad de medida es W/m^2 o W/cm^2 . La fluencia o dosis de UV (H') es la cantidad total de energía radiante incidente desde todas las direcciones sobre una esfera infinitamente pequeña de área tangencial dA , por lo que se cuantifica con las siguientes unidades: J/m^2 o J/cm^2 . Para determinar la energía de fluencia, se debe multiplicar la tasa de fluencia por el tiempo de exposición. Para ello se utiliza un radiómetro calibrado (Koutchma *et al.*, 2009).

3.4.2 Uso de atmósferas modificadas

Las modificaciones del ambiente de llenado utilizando distintos gases puede ser una alternativa para mantener un ambiente limpio durante el envasado, evitar oxidaciones y el crecimiento de microorganismos. Los principales gases utilizados para estos casos son el CO₂, N₂ y O₂ superatmosférico. El aire está compuesto de alrededor 0,03% de dióxido de carbono, 78% de nitrógeno, y 21% de oxígeno. En los sistemas de atmósferas modificadas, se realizan mezclas de gases, dependiendo del efecto deseado (Venugopal, 2005; Sebranek & Houser, 2006).

3.4.2.1 Dióxido de carbono (CO₂)

Se ha demostrado que es un gas antimicrobiano, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos, afectando la fase lag y la tasa máxima de crecimiento. A niveles de 5% en empaques genera un efecto bacteriostático. El modo de acción, aunque todavía no se entiende completamente, se cree que es debido a una serie de efectos, incluyendo cambios en el pH intracelular, la alteración de proteínas y la estructura de enzimas. Lo anterior genera alteraciones en las funciones de la membrana celular, causando el efecto antimicrobiano, el cual aumenta a bajas temperaturas (Venugopal, 2005).

3.4.2.2 Nitrógeno (N₂)

El nitrógeno es un gas inerte que se utiliza para disminuir la cantidad de oxígeno presente en el ambiente y así evitar la rancidez y oxidación en productos alimenticios. Se utiliza para evitar cambios sensoriales y pérdida de compuestos de importancia nutricional. Este gas no posee efecto directo en el crecimiento microbiano (Sebranek & Houser, 2006).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diagnóstico de la situación actual de la empresa

La empresa interesada en el presente proyecto procesa frutas y vegetales. El agua de pipa representa para la compañía uno de los productos más importantes en cuanto a producción y volumen de ventas. La empresa desea exportar este producto, sin embargo, cuenta con el inconveniente de poseer una vida útil muy corta para lograrlo. Este problema se corroboró con estudios previos realizados en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA).

La empresa ha expresado su necesidad de encontrar un proceso que permita alargar la estabilidad del producto para exportarlo, de ahí su interés y disposición por la realización del presente proyecto de graduación. Debido a lo anterior, la empresa ha aceptado brindar la materia prima, es decir agua de pipa fresca, envases e información necesaria, con el fin de realizar las pruebas pertinentes. A la vez, se estableció un convenio con Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) con posibilidad de licenciamiento utilizando la tecnología de microfiltración tangencial (MFT).

Actualmente, la empresa realiza el procesamiento del agua de pipa adicionando sorbato de potasio como conservante y realiza un tratamiento térmico, con el fin de disminuir la carga microbiana. Con este procesamiento, el producto cuenta con una vida útil de 12 días aproximadamente. La empresa desea buscar una metodología que permita extender la vida útil por lo menos a 30 días. El producto se almacena y transporta en refrigeración a 5 °C. Las operaciones y el proceso actual realizado por la empresa para obtener el agua de pipa se observa en la **Figura 8**.

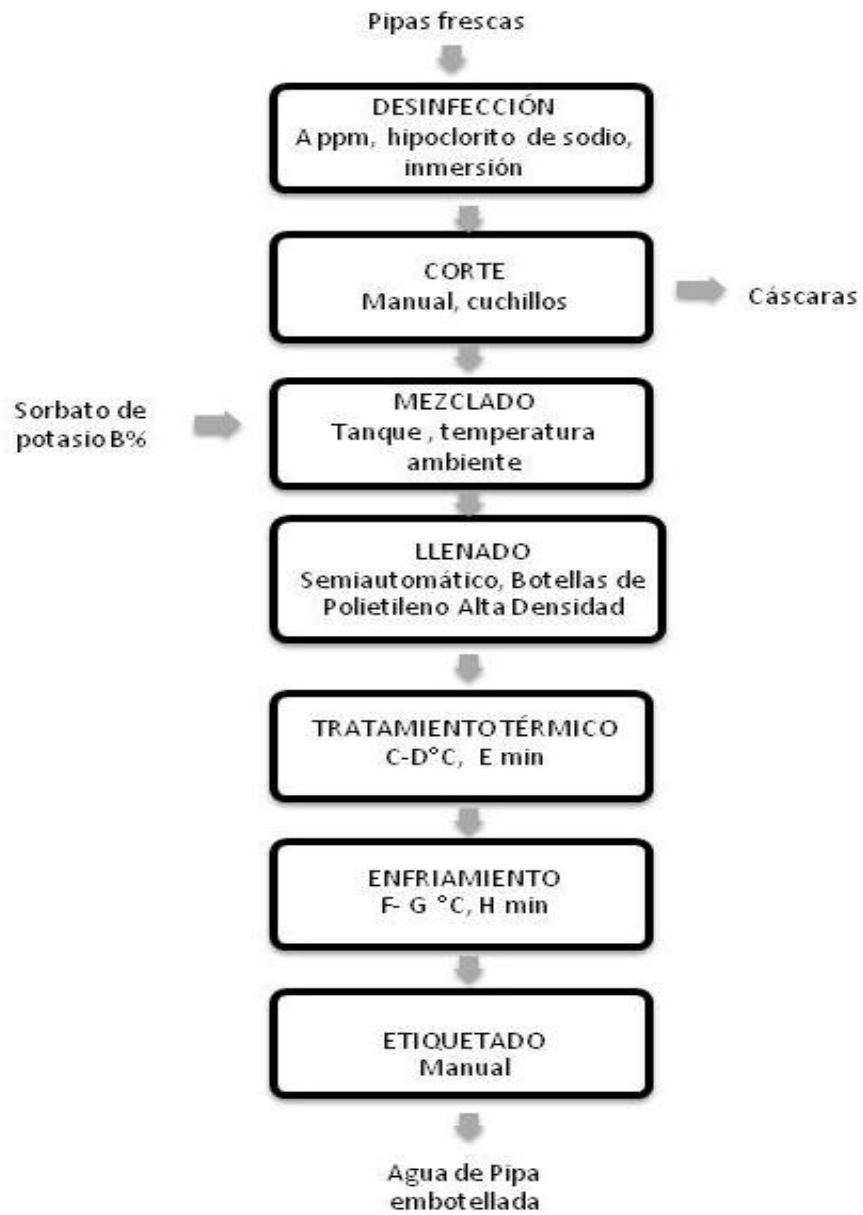


Figura 8. Flujo de proceso para elaboración de agua de pipa realizado en la empresa procesadora de frutas y hortalizas.

4.2 Localización del proyecto

El proyecto se realizó en las instalaciones de la Universidad de Costa Rica, localizada en San Pedro de Montes de Oca, en la provincia de San José. Las pruebas de desinfección de envases, la microfiltración tangencial y el envasado en la cámara con luz ultravioleta del agua de pipa (*Cocos nucifera* L.) se llevaron a cabo en las instalaciones de la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Las evaluaciones sensoriales, físico-químicas y microbiológicas del agua de pipa (*Cocos nucifera* L.) se realizaron en los laboratorios del CITA.

4.3 Materias primas

Se utilizó agua de pipa fresca, obtenida del fruto denominado *Cocos nucifera* L. La empresa procesadora de agua de pipa obtiene esta materia de proveedores provenientes de la zona de Guápiles, en Limón. Para cada prueba se utilizó agua de pipa extraída el mismo día de procesamiento. La materia prima utilizada presentó un pH en un rango entre 4,94 y 5,05 y sólidos solubles en un rango entre 5,5 y 5,6 °Brix.

4.4 Envases

Los envases utilizados para empacar el agua de pipa procesada fueron los utilizados actualmente por la empresa, lo cuales son de plástico, semitransparentes de polietileno de alta densidad, con un volumen de 1,0 L.

4.5 Descripción del equipo

El equipo piloto de microfiltración utilizado está compuesto por un módulo tubular de membrana multicanal de cerámica alúmina Zircón (Marca X) posee un área efectiva total de filtración de $J\ m^2$ y poros con un diámetro promedio de $0,2\ \mu m$ (Montero, 2008).

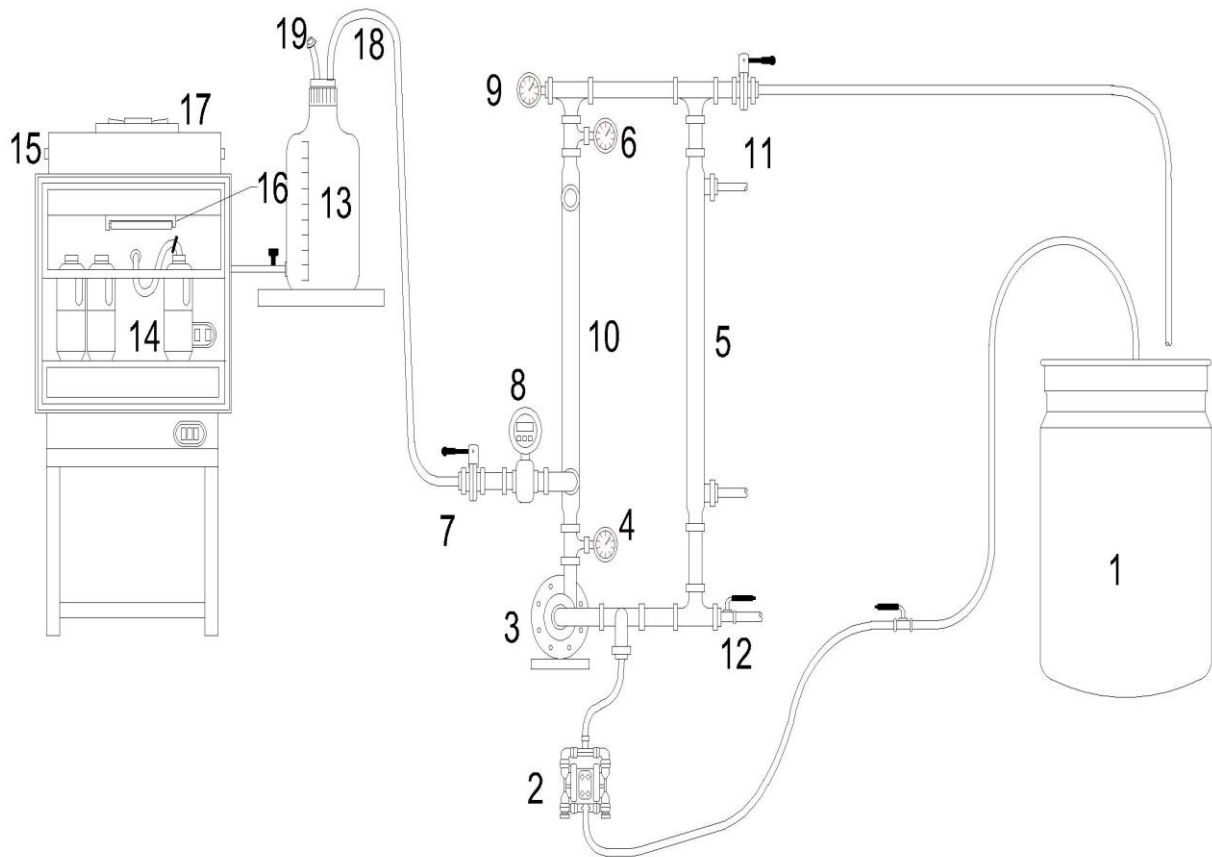
El volumen muerto del equipo es de 4,156 L. Se utilizó una bomba centrífuga alimentada por una bomba neumática para generar el flujo tangencial. La temperatura fue medida con un termómetro de espiga (± 1 °C) instalado en la salida de la membrana. La presión de entrada y salida de la membrana se midió con manómetros y el flujo de permeado con un flujómetro electromagnético. Para el caso de los ensayos de larga duración se utilizó una bomba centrífuga distinta, que generó un volumen muerto de 4,733 L.

Para los estudios de almacenamiento, el microfiltrador se acopló a un sistema de llenado con luz ultravioleta (UV-C). Para ello, se conectó una manguera entre la salida de permeado y un tanque de retención plástico que se comunica con la cámara de llenado. Esta cámara cuenta con ventanas de vidrio, ventilador, un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air), lámpara de luz UV-C y una lámpara de luz fluorescente, además de un fregadero de acero inoxidable.

El filtro HEPA utilizado es de alta eficiencia pues retiene contaminantes y partículas muy pequeñas; está compuesto por fibras de vidrio, con diámetros de entre 0,2 y 0,5 μm . El bombillo de luz ultravioleta posee una potencia fija y es de marca Sylvania. La intensidad de la luz no puede regularse. Por su parte, el ventilador funcionó como extractor de aire, ya que genera una presión positiva dentro de la cámara impidiendo la entrada de aire del ambiente (Flanders Corporation, 2003).

La cámara fue desinfectada 25 minutos antes de su utilización con rayos UV-C y se mantuvo encendida la luz ultravioleta mientras se realizó el llenado de las botellas, con el fin de evitar contaminaciones. Para la etapa de envasado, se utilizaron guantes y una máscara plástica con el fin de impedir que las radiaciones penetraran la piel del encargado de la operación. Se realizó el envasado de agua de pipa en los recipientes desinfectados, descritos en la sección 4.6.3.

El sistema de llenado se desinfectó utilizando *Desinfectante I* a 1600ppm, permitiendo que pase por la membrana, posteriormente por el tanque plástico de retención y por último por la tubería, hasta llegar a la zona de envasado. Seguido del paso del desinfectante, fluye por todo el sistema agua suavizada, hasta alcanzar un valor de pH de $7,0 \pm 1$ en la salida de la cámara con luz UV. En la **Figura 9** se puede observar un esquema del equipo de microfiltración tangencial acoplado al sistema de llenado.



1	Tanque plástico de alimentación
2	Bomba neumática
3	Bomba centrífuga
4	Manómetro presión de entrada
5	Intercambiador de calor
6	Manómetro presión de salida
7	Salida de permeado
8	Flujómetro
9	Termómetro de espiga
10	Membrana

11	Salida de recirculado
12	Salida de retenido
13	Tanque plástico de retención
14	Cámara de llenado
15	Filtro HEPA
16	Luz UV
17	Ventilador
18	Manguera de llenado de Tanque de retención
19	Filtro de aire

Figura 9. Esquema del sistema de llenado con luz UV acoplado al proceso de microfiltración tangencial.

4.6 Pruebas preliminares

4.6.1 Funcionamiento del equipo

Se realizó un ensayo como prueba preliminar utilizando 20 L de agua de pipa con el fin de probar el funcionamiento del equipo con este producto. Durante estas pruebas se determinaron los ajustes necesarios en temperatura, presión transmembranaria y flujo de permeado.

Para ello se midió la presión de ingreso y salida de la membrana, utilizando los manómetros del equipo. El flujo de permeado se determinó mediante un flujómetro y la temperatura se determinó con el termómetro de espiga que posee el equipo.

Para evaluar el efecto de la presión, se realizó un ensayo de microfiltración utilizando varias presiones, manteniendo la temperatura a $L \pm 1$ °C. Se utilizaron presiones transmembranarias de prueba de M; N; O; P; Q; R y S bar (en orden ascendente), y cada presión se mantuvo constante durante 30 minutos para estabilizar el equipo; los ensayos se realizaron a una velocidad tangencial de $K \pm 0,2$ m/s. Para cada presión se tomaron valores de flujo de permeado cada minuto durante los últimos 10 minutos, utilizando la pendiente de volumen de permeado respecto al tiempo. Se tomaron datos del flujo de permeado, presión de ingreso y salida de la membrana. Después de la toma de datos, se incrementó la presión al valor siguiente. Visualmente se determinó, de acuerdo a la gráfica obtenida, la presión transmembranaria que permitió obtener los flujos de permeado más promisorios para el proceso.

En todos los casos, las muestras de permeado y retenido, para cada presión, fueron tomadas en el último instante y las cantidades nunca excedieron 50 mL. El permeado fue introducido de nuevo al tanque de alimentación con el fin de mantener una concentración de alimentación constante. Las pruebas se realizaron a un valor de factor de reducción volumétrico (FRV) cercano a 1,5 (adimensional). Se evaluó los sólidos solubles (°Brix) contenidos en el permeado y retenido al trabajar con cada una de las presiones evaluadas con el fin de observar si la presión generaba un efecto en la retención o el paso de sólidos solubles a través de la membrana.

4.6.2 Estudio de almacenamiento preliminar

Se realizaron pruebas preliminares con agua de pipa microfiltrada y envasada en la cámara con luz UV, en recipientes desinfectados según las recomendaciones del proveedor del desinfectante, cuyo agente activo es ácido peracético y no requiere enjuague posterior. Las muestras se almacenaron a 4 °C, se tomaron dos botellas con agua de pipa cada semana, durante 5 semanas distintas de almacenamiento, con el fin de analizar el color, pH, sólidos solubles, turbidez y recuentos microbiológicos de microorganismos totales aerobios y mohos y levaduras. Estas pruebas se realizaron para observar el comportamiento del producto durante el tiempo e identificar los principales factores de deterioro en el agua de pipa y contemplarlos en las pruebas definitivas (ver sección 4.8).

Durante esta prueba se adicionó ácido ascórbico como antioxidante, evaluando el uso de dos concentraciones: T ppm y V ppm (donde $T < V$), de acuerdo con parámetros utilizados en otros estudios (Ovalles *et al.*, 2002; Das Purkayastha *et al.*, 2012).

4.6.3 Desinfección de envases

Se utilizaron botellas con las características indicadas en la sección 4.4. Se aplicó el *Desinfectante I* en una concentración de W ppm por X minutos, seguidamente las botellas se colocaron en una disolución a Y ppm (donde $W > Y$), mientras se realizaba el llenado.

Para evaluar la efectividad de la desinfección se realizó una inoculación en botellas brindadas por la empresa. Estas se inocularon con una cepa de *E. coli* no patogénica y se utilizó la técnica de McFarland recomendada por BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing (2012). Para ello se comparó con el estándar de McFarland 1,0. La preparación del mismo y el ajuste de turbidez son descritos por BSAC (2012).

Las botellas se inocularon con 0,50 mL del estándar; para ello se colocaron gotas en el interior de las mismas y se esperó a que el inóculo se secase. Posteriormente se realizó la desinfección de las botellas a una concentración de Y ppm por Z minutos. Se realizó un recuento de *E. coli* de acuerdo con lo establecido por el FDA, descrito en Bacteriological Analytical Manual

(Feng *et al.*, 1998). El procedimiento se realizó utilizando 6 botellas y empleando agar Mac Conkey como medio de cultivo. En la **Figura 10** se describe el procedimiento utilizado para la evaluación del efecto de la aplicación del desinfectante en los envases sobre la reducción de *E. coli*.

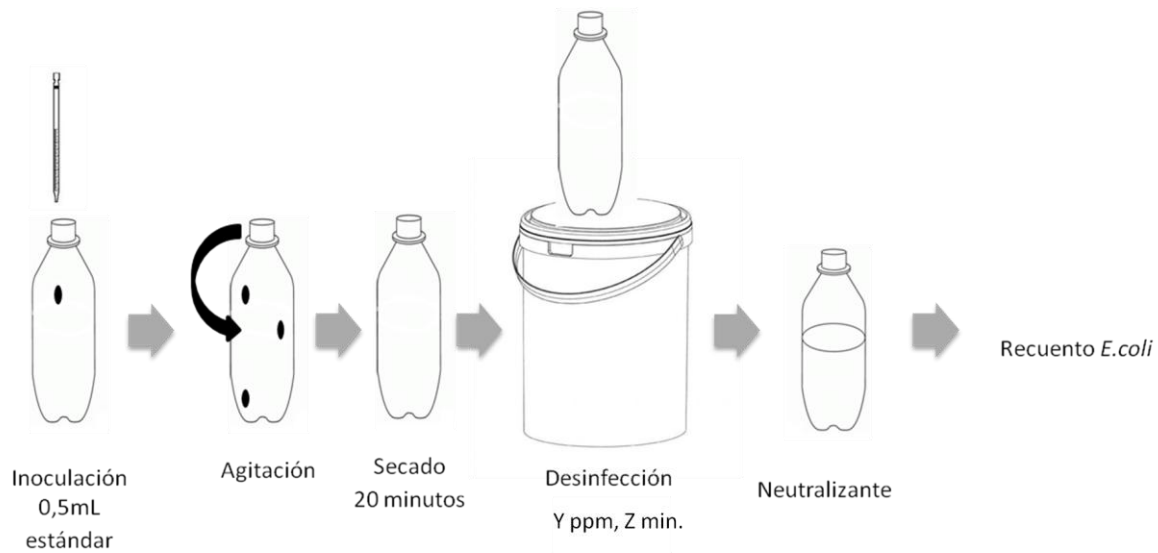


Figura 10. Procedimiento realizado para evaluación de la desinfección de envases contenedores de agua de pipa.

Es de importancia no causar cambios sensoriales en la bebida por la desinfección de los envases, es decir, que no se transmitan sabores u olores indeseables. Debido a lo anterior, se realizó una prueba sensorial, de diferencia comparando el producto almacenado en botellas desinfectadas y en botellas sin desinfectar para determinar si se percibían modificaciones en el producto al realizar o no la desinfección. Para ello se desinfectaron las botellas, se llenaron con agua de pipa y se almacenaron por 2 días entre 4 y 7 °C, por último, se realizó la prueba sensorial, como se muestra en las **Figura 11** y **Figura 12**.

Se ejecutó una prueba de diferenciación, específicamente una prueba triangular, para determinar si los panelistas detectaban diferencia entre el agua de pipa contenida en la botella sin desinfectar y el agua de pipa embotellada en envases desinfectados. La metodología para realizar esta prueba es descrita por Hough & Fiszaman (2005).

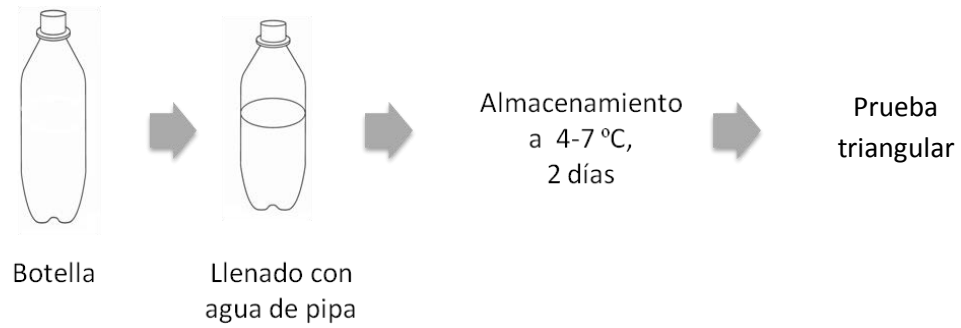


Figura 11. Procedimiento realizado para las botellas sin desinfectar analizadas sensorialmente.



Figura 12. Procedimiento realizado para las botellas desinfectadas analizadas sensorialmente.

4.7 Pruebas definitivas

4.7.1 Estudio de almacenamiento de agua de pipa

Se realizaron dos métodos de envasado, microfiltración del agua de pipa y microfiltración acoplada al sistema de llenado con luz UV. Se tomaron muestras de agua de pipa microfiltrada, las cuales se envasaron en botellas de plástico en la salida del permeado, previamente desinfectadas según se describe en la sección 4.6.3. Para evaluar el efecto del llenado en la cámara diseñada, las botellas se envasaron a la salida de la cámara, con las mismas condiciones de desinfección. Al realizar cada uno de los tratamientos, el agua de pipa se almacenó en refrigeración, a una temperatura de 4 °C. El producto se almacenó durante 42 días, tomando muestras cada 7 días para realizar análisis microbiológicos y físico-químicos (pH, turbidez, sólidos solubles y color).

Las muestras se tomaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42; siendo estos muestreos equidistantes. Para la realización del estudio se utilizaron 3 lotes distintos de producción de agua de pipa, se aplicaron ambos tratamientos y se determinaron las variables físico-químicas y microbiológicas. Las pruebas sensoriales, por razones de costo y logística se realizaron solamente con un lote de producción, contemplando que contaran con parámetros físico-químicos y microbiológicos semejantes a los dos lotes anteriores. En el Cuadro V se muestran los métodos de análisis para cada prueba y el Cuadro VI indica el cronograma y codificación de muestreo para una prueba.

Cuadro V. Métodos de análisis a realizar para cada prueba utilizando agua de pipa con diferentes métodos de envasado.

Prueba	Lote	Método de envasado	Métodos de análisis *
1	A	MFT	Análisis microbiológicos y físico-químicos
		MFT + CUV	Análisis microbiológicos y físico-químicos
2	B	MFT	Análisis microbiológicos y físico-químicos
		MFT + CUV	Análisis microbiológicos y físico-químicos
3	C	MFT	Análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales
		MFT + CUV	Análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales

MFT: microfiltración tangencial. **MFT + CUV:** microfiltración tangencial y envasado en cámara con luz UV.

*Especificados en sección 4.8.

Cuadro VI. Cronograma de muestreo y codificación de las muestras para el estudio de almacenamiento de agua de pipa de una prueba con diferentes métodos de envasado.

Tiempo (Día)	MFT	MFT+CUV
0	M0-1	MC0-1
	M0-2	MC0-2
	M0-3	MC0-3
7	M7-1	MC7-1
	M7-2	MC7-2
	M7-3	MC7-3
14	M14-1	MC14-1
	M14-2	MC14-2
	M14-3	MC14-3
21	M21-1	MC21-1
	M21-2	MC21-2
	M21-3	MC21-3
28	M28-1	MC28-1
	M28-2	MC28-2
	M28-3	MC28-3
35	M35-1	MC35-1
	M35-2	MC35-2
	M35-3	MC35-3
42	M42-1	MC42-1
	M42-2	MC42-2
	M42-3	MC42-3

MFT: microfiltración tangencial

MFT +CUV: microfiltración tangencial y envasado en cámara con luz UV.

Para el estudio de almacenamiento, se aplicó un diseño de bloques completos aleatorizados, donde el bloque se aplica a los lotes de materia prima utilizados. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para ver el efecto del tipo de envasado y observar si hay interacción del tiempo de almacenamiento con respecto al tipo de envasado. Las pruebas y análisis sensoriales realizados se detallan en las secciones 4.8.3.2 y 4.8.3.3.

Además, debido a que se consideró que el tipo de envase utilizado puede afectar la conservación del producto, se evaluó el uso de dos distintas botellas, con diferente material: tereftalato de polietileno (PET) y vidrio. Lo anterior, con el fin de realizar una recomendación para un futuro cambio de empaque. Para ello, se envasaron muestras de agua de pipa únicamente MFT y se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C. El día 30 de almacenamiento, se

probaron las muestras con el fin de percibir sus características sensoriales, se tomó una botella de cada material evaluado y se realizó la prueba de *E. coli* descrita en la sección 4.82

4.7.2 Evaluación del desempeño de la microfiltración tangencial de agua de pipa (*Cocos nucifera* L.)

El proceso de microfiltración se llevó a cabo con el equipo descrito en la sección 4.5. La temperatura utilizada fue de $L \pm 1$ °C y la presión transmembranaria utilizada fue determinada en la prueba preliminar descrita en la sección 4.6.1. Se realizaron 4 ensayos y se tomaron datos de temperatura, flujo y presión transmembranaria cada minuto. Se determinó el rendimiento óptimo y flujo de permeado (J_p) en la microfiltración de agua de pipa.

Para analizar el desempeño de la microfiltración tangencial de agua de pipa, se realizó una comparación de gráficas del proceso con el fin de evaluar el flujo de permeado y el factor de reducción volumétrica (FRV) en función del tiempo. Los cálculos se realizaron de acuerdo con las ecuaciones indicadas en la sección 3.3.3.

Debido a que se observó una disminución en los flujos de los ensayos 3 y 4, respecto a los ensayos 1 y 2, se realizó un análisis de varianza con el fin de identificar si se presentaron diferencias significativas en los flujos de permeado de estos ensayos.

4.7.3 Proceso de microfiltración tangencial durante ensayos de larga duración

Se evaluó el comportamiento del proceso de microfiltración tangencial; para ello se realizaron dos ensayos de larga duración, de 6 horas máximo. Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar el rendimiento del proceso al alcanzar el FRV óptimo, el cual fue determinado previamente en las pruebas realizadas en la planta piloto del CITA. Durante estos ensayos se calculó el flujo de retenido, el flujo de permeado y el rendimiento, como se indicó en la sección 3.3.3.

Los ensayos se realizaron a una menor velocidad tangencial (M m/s), debido a fallos en la bomba centrífuga utilizada en las pruebas anteriores. Se realizó un análisis de varianza con el fin de comprar los flujos de permeado obtenidos con distinta velocidad tangencial, a un FRV de 15.

4.7.4 Preferencia del agua de pipa microfiltrada y envasada con luz UV respecto al agua de pipa procesada actualmente por la empresa procesadora

Se comparó, mediante una prueba sensorial de preferencia, el agua de pipa elaborada actualmente por la empresa procesadora de frutas y hortalizas respecto al agua de pipa obtenida mediante el proceso de microfiltración tangencial. Según Hein *et al.* (2008) al realizar cambios en el procesamiento de un alimento es necesario evaluar la preferencia del consumidor, pues permite predecir si el nuevo producto será comprado de igual manera que el producto actual, o si eventualmente se podrían presentar cambios en las ventas por las modificaciones en el proceso. En la sección 4.8.3.4 se describe la metodología utilizada para la prueba de preferencia.

4.8 Métodos de análisis

4.8.1 Métodos de análisis físico-químicos

4.8.1.1 Determinación del pH

Se determinó el pH de acuerdo con el método establecido por la AOAC 981.12 (AOAC, 1999), utilizando un pHmetro.

4.8.1.2 Determinación de sólidos solubles

Se realizó utilizando un refractómetro Abbé con control de temperatura según el método AOAC 932.12 (AOAC, 1999).

4.8.1.3 Determinación de turbidez

Se llevó a cabo utilizando un turbidímetro de laboratorio HACH, modelo 2100AN, USA ($\pm 20\%$ de la lectura). Los valores se expresan en NTU, unidades nefelométricas de turbidez. Se midió la turbidez tomando 30 mL de muestra, la cual se agitó levemente 4 veces antes de tomar la lectura. Se determinó el valor 30 segundos después de colocar la muestra en el equipo.

4.8.1.4 Determinación de color

Se analizó el color utilizando un colorímetro marca HunterLab, modelo Color Flex. Se determinó el color bajo los parámetros L^* , a^* y b^* , utilizando una fuente de luz D65, ángulo de visión de 10° y con una geometría óptica 45/0. Se determinó la diferencia de color con la siguiente ecuación, según Gonnet (1998):

(Ecuación 7)

El parámetro L^* representa la luminosidad, siendo el 0 el color negro y 100 el blanco. El valor a^* corresponde a una escala de color de rojo a verde; mientras que el b^* representa el color amarillo y azul, como se observa en la **Figura 13**.

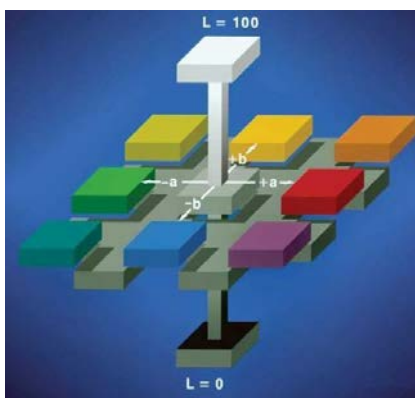


Figura 13. Diagrama del espacio colorimétrico para los parámetros L^* , a^* y b^* (Hunter Lab, 2003).

4.8.2 Métodos de análisis microbiológicos

Se realizó el recuento total aerobio y el recuento de mohos y levaduras. La metodología utilizada para el recuento total aerobio es la indicada por el FDA, P-SA-MM-001, descrita por Maturin & Peeler (2001). Para el recuento de mohos y levaduras, se utilizó el mismo manual del FDA, en este caso el capítulo 18 descrito por Tournas *et al.* (2001), realizando las modificaciones descritas a continuación.

Se utilizaron tres placas petri con agar papa dextrosa y se les añadió un total de 1 mL de la disolución de la muestra de 10^{-1} , con el fin de disminuir el límite de detección de la prueba, pues se esperaba contar con recuentos de mohos y levaduras menores a 100 UFC/mL.

Se cuantificó también *E. coli* mediante la metodología de Número Más Probable de acuerdo con los procedimientos P-SA-MM-002, P-SA-MM-003 y P-SA-MM-004 (CITA, 2010a; CITA, 2010b; CITA, 2010c).

4.8.3 Métodos de análisis sensoriales

4.8.3.1 Prueba de diferencia para evaluación de la desinfección de las botellas

Se realizó una prueba triangular utilizando 20 panelistas entrenados. Los evaluadores estaban familiarizados con la prueba y con el producto a evaluar. Se entregó a los panelistas muestras de agua de pipa envasada en botellas desinfectadas y muestras de agua de pipa envasada en botellas sin desinfectar. A cada panelista se le presentaron tres muestras codificadas: dos muestras eran idénticas y una diferente. Se preparó igual número de seis posibles combinaciones de muestras. Cada evaluador probó las muestras e indicó cuál era la que consideró diferente (Hough & Fiszman 2005).

Los datos de la prueba de diferencia se analizaron estadísticamente, determinando la cantidad mínima de aciertos que se deben presentar según la cantidad de panelistas utilizados para asegurar o no que se percibe la diferencia entre las muestras. Para ello se utilizan las tablas binomiales de Roessler *et al.* (1978).

4.8.3.2 Análisis sensorial descriptivo para estudio de almacenamiento

Las muestras de agua de pipa destinadas al análisis sensorial, el día de almacenamiento respectivo, se retiraron de la cámara de refrigeración a 4 °C y se colocaron en congelación a -20 °C. Las muestras se descongelaron en refrigeración antes de realizar las pruebas detalladas a continuación. Las pruebas sensoriales para el estudio de almacenamiento se realizaron para el lote 1 de agua de pipa.

Durante una evaluación preliminar se determinaron las características críticas del producto, es decir, los parámetros o descriptores que sensorialmente influían en la calidad del producto. Con base en los resultados anteriores, se realizó una prueba con 24 panelistas entrenados en el uso de escalas de intensidad, para calificar las muestras almacenadas con distinto tiempo. Para ello se empleó una escala lineal de 10 cm no estructurada. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA, contemplando el tiempo nominal, y posteriormente se aplicó una prueba de Tukey.

4.8.3.3 Pruebas de agrado sensorial para estudio de almacenamiento

Las muestras de agua de pipa utilizadas para las pruebas de agrado se trataron de igual manera que las muestras destinadas al análisis sensorial descriptivo, indicado en la sección 4.8.3.2. Para analizar el agrado del agua de pipa según los diferentes días de almacenamiento, se realizaron pruebas con 95 consumidores cada una. Durante la prueba se entregaron a los panelistas muestras únicamente microfiltradas. Se presentaron a los panelistas 7 muestras, una de cada día de almacenamiento: 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42. Se utilizó una escala hedónica de tipo lineal. Las muestras se presentaron de manera balanceada y aleatoria. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA, contemplando el tiempo nominal, y posteriormente se aplicó una prueba de Tukey.

4.8.3.4 Prueba de preferencia

Durante esta prueba se entregó a los 100 panelistas dos muestras, una de agua de pipa fresca microfiltrada y otra del agua de pipa actualmente comercializada por la empresa. En este caso los panelistas indicaban cuál de las muestras preferían. Se incluyó la categoría de no preferencia. Se realizó un análisis binomial con las tablas de Roessler *et al.* (1978).

5 RESULTADOS

5.1 Pruebas preliminares

5.1.1 Funcionamiento del equipo

5.1.1.1 Determinación de la presión óptima de proceso para la MFT de agua de pipa

En la **Figura 14** se puede observar el comportamiento del flujo de permeado respecto a la aplicación de diferentes presiones transmembranarias. Según Sotto (2008) con algunos productos, es posible que a mayor presión a través de la membrana, aumente el flujo de permeado pues se incrementa la fuerza motriz, venciendo la fuerza ocasionada por la membrana.

En el caso del agua de pipa, se muestra que para los primeros cuatro valores de presiones evaluadas, se presenta un aumento en el flujo de permeado promedio de 76 L/hm^2 . Al analizar presiones mayores, se observa que los incrementos en los flujos son menores, contando con un promedio de aumento en los flujos de 11 L/hm^2 .

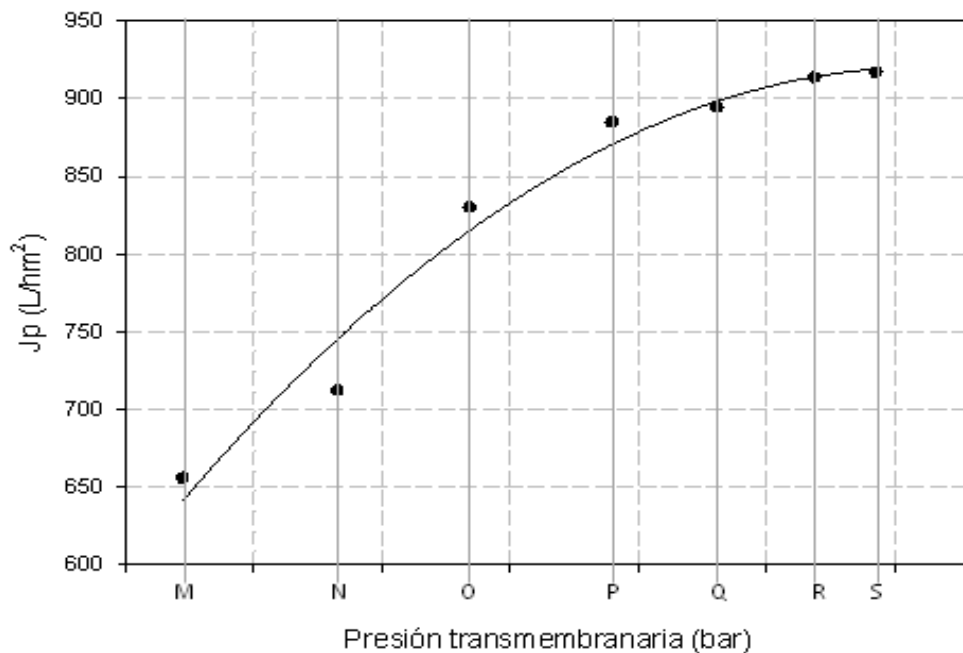


Figura 14. Comportamiento del flujo de permeado respecto a la presión transmembranaria utilizada en la MFT de agua de pipa.

Según varios autores, durante procesos de MFT, se presenta un rango de presión controlada, donde los flujos de permeado son directamente proporcionales a la presión transmembranaria utilizada, y esto se presenta cuando se procesa a bajas presiones, bajas concentraciones de sólidos y altas velocidades tangenciales. Posteriormente, a mayores presiones de trabajo se presenta una disminución en el cambio de los flujos y se conoce como región de transferencia de masa controlada. Como se observa en la **Figura 14**, se cumple el comportamiento mencionado anteriormente (Montero, 2008).

Se ha comprobado que para el caso de algunos jugos, la aplicación de una presión transmembranaria cada vez más alta causa que el flujo de permeado inicialmente sea también alto, sin embargo, teóricamente, se presenta un punto máximo, después del cual se puede generar el bloqueo de los poros de la membrana. Estudios con rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), caldos de fermentación y jugo de mora (*Rubus adenotrichos*) han presentado comportamientos similares. En el caso del agua de pipa evaluada, a una presión transmembranaria de más de P bar, el flujo aumenta lentamente, por lo que se considera que es innecesario procesar a presiones más altas, pues los costos energéticos serían mayores comparados con el beneficio en el aumento del flujo de permeado (Salas, 2003; Montero, 2008; Orozco *et al.*, 2008; Cisse *et al.*, 2011).

Es importante evaluar el flujo de permeado respecto a la presión transmembranaria, debido a que se pueden presentar distintos comportamientos dependiendo de las características de la materia prima. Para el caso de otros jugos de frutas se ha evidenciado disminución del flujo a mayores presiones, por colmatación rápida de la membrana, principalmente por alto contenido de sólidos. También se ha descrito que factores como la concentración de enzima, la temperatura y velocidad tangencial afectan este comportamiento (Chaverri, 2003; Salas, 2003; Montero, 2008).

5.1.1.2 Evaluación de sólidos solubles al utilizar distintas presiones

Al evaluar los sólidos solubles del agua de pipa al microfiltrar con distintas presiones transmembranarias se observó que tanto para el permeado como para el retenido, este parámetro se mantiene constante en el agua de pipa. Para todas las presiones evaluadas, se presentó un valor de 4,0 °Brix. Es decir, al aumentar la presión, no se presentó retención de sólidos solubles en el proceso de microfiltración del agua de pipa. Se considera que el agua de pipa

al contar con poca cantidad de sólidos solubles e insolubles, se presenta una distribución a través de la membrana que permite contar con sólidos solubles semejantes a la materia prima. Resultados similares respecto a los sólidos solubles se han obtenido al microfiltrar mango variedad Kent, mango variedad Tommy Atkins y chirimoya (INIAP, 2003).

Otros autores han obtenido resultados distintos al trabajar con diferentes jugos como materias primas. En el caso de León y Rosero (2009), quienes microfiltraron jugo de uvilla (*Physalis peruviana*. L.), demostraron que al procesar a una presión transmembranaria de 3,5 bar, el permeado presentaba una reducción de 23,56% de los °Brix respecto al jugo inicial. En el caso de guayaba rosada (*Psidium guajava*), se ha presentado una disminución del 28,5 % de los sólidos solubles del jugo fresco respecto al jugo microfiltrado (INIAP, 2003).

Debido a que no se presentó retención de sólidos solubles al modificar la presión transmembranaria y que una presión de P bar resultó ser promisoría para la obtención de flujos de permeado adecuados, se decidió seleccionar una presión transmembranaria de P bar para procesar el agua de pipa.

5.1.1.3 Comportamiento de parámetros operacionales

En un ensayo preliminar se microfiltró agua de pipa, y se observó el comportamiento del flujo de permeado y del FRV durante el tiempo; los resultados se evidencian en la **Figura 15**. Se encontró que la temperatura mínima que se logra alcanzar al procesar con el equipo piloto fue de L °C, empleando el sistema de enfriamiento instalado. Se nota un decrecimiento rápido en el flujo de permeado a medida que transcurre el tiempo, mientras que el FRV se va incrementando.

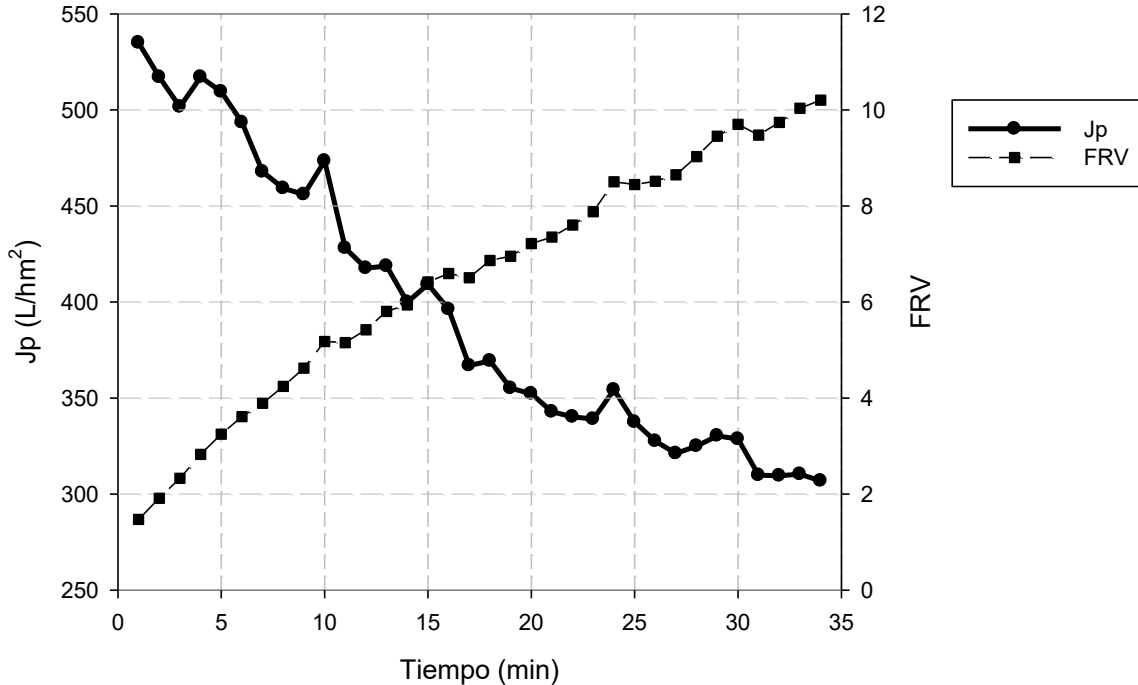


Figura 15. Comportamiento del flujo de permeado (J_p) y FRV de agua de pipa durante un ensayo preliminar de MFT ($T = L \pm 1^\circ\text{C}$, $P = P$ bar).

Según Montero (2008) y Chaverri (2003) se ha determinado que durante los procesos de microfiltración se presentan varias fases de comportamiento para el flujo de permeado. Durante los primeros minutos se presenta una rápida disminución del flujo, posteriormente se presenta una reducción más leve e inconstante y por último tiende a observarse una fase donde se estabiliza el flujo. Según los datos obtenidos se considera que se presenta el comportamiento normal expuesto en la literatura; sin embargo se considera que el flujo no logró estabilizarse completamente, por ser un ensayo de corta duración.

La disminución en el flujo de permeado, según Quesada (2013) se debe a la formación de una capa de gel sobre la superficie de la membrana. Esta resistencia depende de diversos factores, como las propiedades físicas de la capa de gel formada, del tiempo y la presión transmembranaria. Durante el ensayo preliminar se obtuvo un flujo promedio de $394,9 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$. En otros estudios de microfiltración tangencial con diferentes jugos se han obtenido flujos de permeado promedio en las etapas iniciales de proceso menores a los obtenidos en este caso para el agua de pipa. Para piña se han obtenido flujos iniciales promedio de $200\text{-}300 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$, para mora de $330 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$. Mientras que al iniciar el proceso de microfiltración en mango se han obtenido flujos de 155

L/h·m², para el caso de la anona de 103 L/h·m², para guayaba de 139, 2 L/hm², siendo menores que en el caso del ensayo mostrado en la **Figura 15** (INAP, 2003; Montero, 2008; Quesada, 2013).

Se logró apreciar que a medida que transcurre el tiempo, el FRV aumenta, cumpliendo el comportamiento esperado debido a que es un ensayo realizado a manera de concentración del retenido durante el tiempo, provocando que los materiales colmatantes y el aumento de la viscosidad incrementen la resistencia al flujo de permeado. El volumen de permeado aumenta respecto al tiempo y por ende se presenta un incremento en el FRV (Carneiro *et al.* 2002; Chacón, 2006; Muñoz, 2010; Quesada, 2013).

5.1.2 Estudio de almacenamiento preliminar

5.1.2.1 Evaluación del uso de ácido L- ascórbico como inhibidor enzimático

Al evaluar el uso del ácido ascórbico como antioxidante para evitar la presencia de coloraciones en el agua de pipa y disminución en el valor nutricional, se evidenció que la concentración más promisorio a utilizar fue de V ppm, como se observa en el Cuadro VII.

Cuadro VII. Evaluación del uso de ácido L- ascórbico como inhibidor enzimático en agua de pipa microfiltrada.

Concentración (ppm)*	Observaciones realizadas
V	No se observan cambios de color posterior a 42 días de almacenamiento
T	Se presentan coloraciones rosadas desde el día 22 de almacenamiento

*siendo: V > T

De acuerdo con varios autores, una manera de disminuir la actividad enzimática en el agua de pipa es la adición de ácido L- ascórbico. Según Das Purkayastha *et al.* (2012) la concentración máxima de ácido L- ascórbico en agua de pipa microfiltrada debe ser de V ppm, debido a que a mayores concentraciones se percibe un sabor metálico residual. Por otra parte, Ovalles *et al.* (2002) recomiendan aplicar una concentración de 150 ppm.

Según los resultados del Cuadro VII, se evidencia que la concentración de T ppm no permitió el mantenimiento del color del agua de pipa por más de 22 días, como se muestra en la **Figura 16**,

mientras que la aplicación de una concentración de V ppm permitió el mantenimiento del color hasta por más de 42 días.

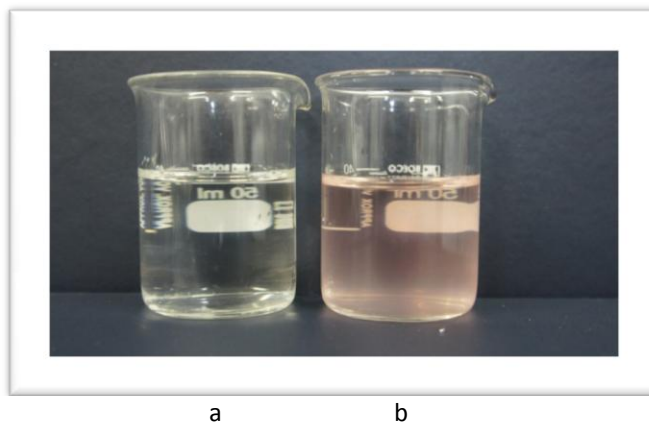


Figura 16. Evaluación del uso de ácido L- ascórbico como inhibidor enzimático en agua de pipa microfiltrada (a) con V ppm y (b) con T ppm.

La efectividad del ácido L- ascórbico añadido va a depender de la variedad de pipa, y la actividad enzimática que posea la materia prima. De acuerdo con Prades *et al.* (2012) la actividad enzimática para agua de pipa costarricense suele ser mayor que la del agua de pipa de otras zonas latinoamericanas como Brasil. Se ha reportado una actividad de $75,0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $9,9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la polifenoloxidasasa (PPO) y la peroxidasa (POD) respectivamente, en el agua de pipa costarricense; mientras que en otras materias primas se reportan actividades menores de $0,1$ a $34,8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la PPO y de $0,1$ - $6,2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la POD. Dado lo anterior, se justifica la necesidad de utilizar la máxima concentración de ácido L- ascórbico recomendada en agua de pipa microfiltrada, para fomentar una adecuada conservación sensorial del producto.

5.1.2.2 Parámetros físico-químicos

Se analizaron distintos parámetros físico-químicos con el fin de observar las tendencias presentadas en el tiempo y definir los parámetros que limitan la calidad del producto. El análisis detallado del comportamiento de cada medición realizada se presenta en la sección de pruebas definitivas (5.2.1).

5.1.2.3 Sólidos solubles

El comportamiento de los sólidos solubles del agua de pipa MFT+CUV se puede observar en la **Figura 17**. La FAO ha establecido un valor de 5,0-6,5° Brix para el agua de pipa, por lo que el producto evaluado cumplió con este parámetro (Codex, 2005; Rolle, 2007).

Otros estudios de almacenamiento de frutas o jugos de frutas han presentado comportamientos similares, donde no se evidencia diferencia en los sólidos solubles a través del tiempo. Ejemplo de ello es el estudio con arándanos (*Vaccinium myrtillus*) que realizó Godoy (2004), y el estudio de jugo de piña (*Ananus comosus L. Merr.*) microfiltrada efectuado por Laorko *et al.* (2013). El comportamiento de este parámetro físico-químico durante las pruebas definitivas se discute en la sección 5.2.1.6, en la cual se muestra también el comportamiento de los sólidos solubles cuando solamente se aplica microfiltración (Codex, 2005; Rolle, 2007).

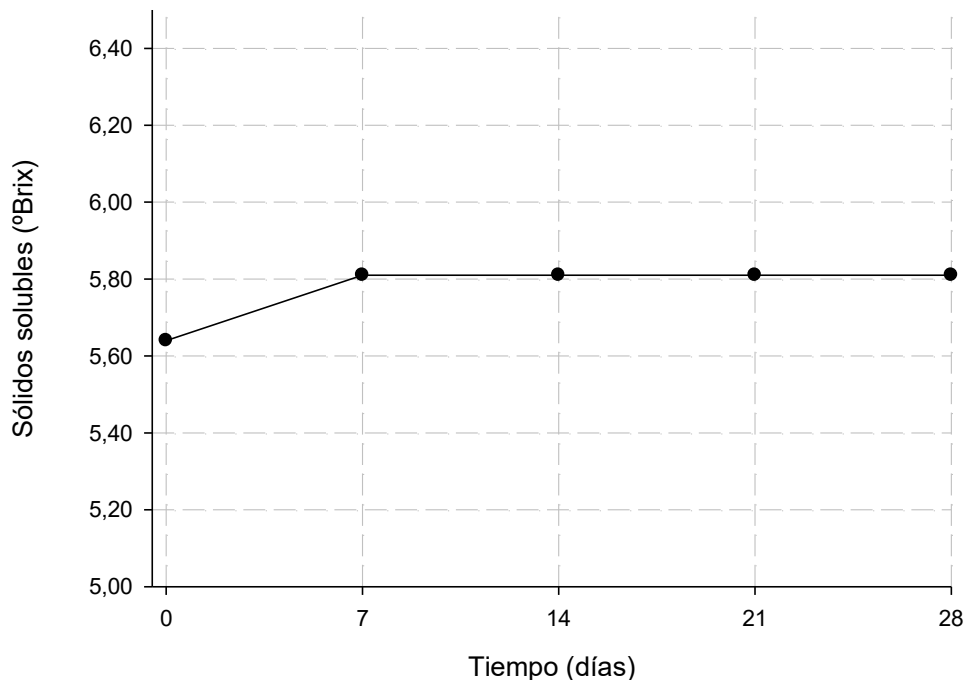


Figura 17. Sólidos solubles promedio (°Brix) de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n= 2).

5.1.2.4 pH

Se determinó el pH para el agua de pipa MFT +CUV, Los valores obtenidos durante cada tiempo se observan en el Cuadro VIII.

Cuadro VIII. Valor de pH promedio del agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C.

Tiempo (días)	*pH
0	4,94 (0,00)
7	4,93 (0,01)
14	4,95 (0,01)
21	4,94 (0,02)
28	4,97 (0,01)

*Datos expresados como promedio (n=2). Valor entre paréntesis: desviación estándar.

A pesar de que se presentaron algunas diferencias en el pH del agua de pipa, se considera que las variaciones de este parámetro son pequeñas y no serían percibidas por el consumidor. Además de acuerdo con distintas investigaciones realizadas, el pH del agua de pipa puede rondar de 4,0 a 6,5; por ello se considera un valor aceptable para este parámetro (Zamora & Godner, 1998; Prades *et al.*, 2012). El comportamiento de este parámetro durante las pruebas definitivas se discute con mayor profundidad en la sección 5.2.1.5.

5.1.2.5 Color

Las percepciones de cambios de color en alimentos se pueden determinar mediante la medición del ΔE . Se han establecido relaciones de este parámetro con la percepción visual del ser humano. Algunos autores indican que los cambios de color no pueden ser identificados, cuando se obtienen valores ΔE de 0-0,5; ligeramente perceptibles con resultados de 0,5-1,0; notables cuando rondan 1,5-3,0; visibles de 3,0- 6,0 y evidentes con valores de 6,0 a 12,0 (Barba *et al.*, 2011).

Otros autores han indicado valores mayores de ΔE en alimentos para poder detectar diferencias visuales y se ha llegado a establecer en algunos casos que los cambios de color serían notorios con resultados de más de 2,0. Se considera que las modificaciones de color en los

alimentos pueden variar de acuerdo con la matriz en la que se evalúe, por ejemplo, se han realizado estudios en condiciones iguales para productos lácteos y jugo de uva, obteniendo a través del tiempo resultados distintos en las modificaciones de color (Barreiro, *et al.*, 1997).

En el Cuadro IX se observa que para el día 21 se presentó un valor mayor a 2,0 en el ΔE . Además, no se evidencia una tendencia creciente en los datos como era de esperarse, ya que en otros estudios se ha encontrado que a medida que transcurre el tiempo, el ΔE tiende a aumentar (Barreiro, *et al.*, 1997).

Cuadro IX. Cambio de color del agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C.

Tiempo (días)	ΔE^*
7	1,36 (0,06)
14	1,64 (0,03)
21	2,01 (0,06)
28	1,94 (0,07)

*Datos expresados como promedio (n= 2). Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Se evidenció que el día 21 de almacenamiento, no se presentaban coloraciones rosadas, amarillas o café; características de actividad enzimática. El producto se encontraba translúcido y con color visualmente semejante a los demás días de evaluación. Además el producto no presentaba malos olores ni sabores, por lo que se considera que el consumidor no percibiría modificaciones en el color. Dado que otros autores han demostrado márgenes menos estrictos de ΔE , mayores a 3,0, para observar cambios de color, se considera que el agua de pipa no presentó cambios notorios de color (Barba *et al.*, 2011). Los resultados de las pruebas definitivas respecto a los cambios de color se analizan en la sección 5.2.1.5.

5.1.2.6 Turbidez

Al evaluar la turbidez, se observó una tendencia creciente en este parámetro a través del tiempo como lo demuestra la **Figura 18**.

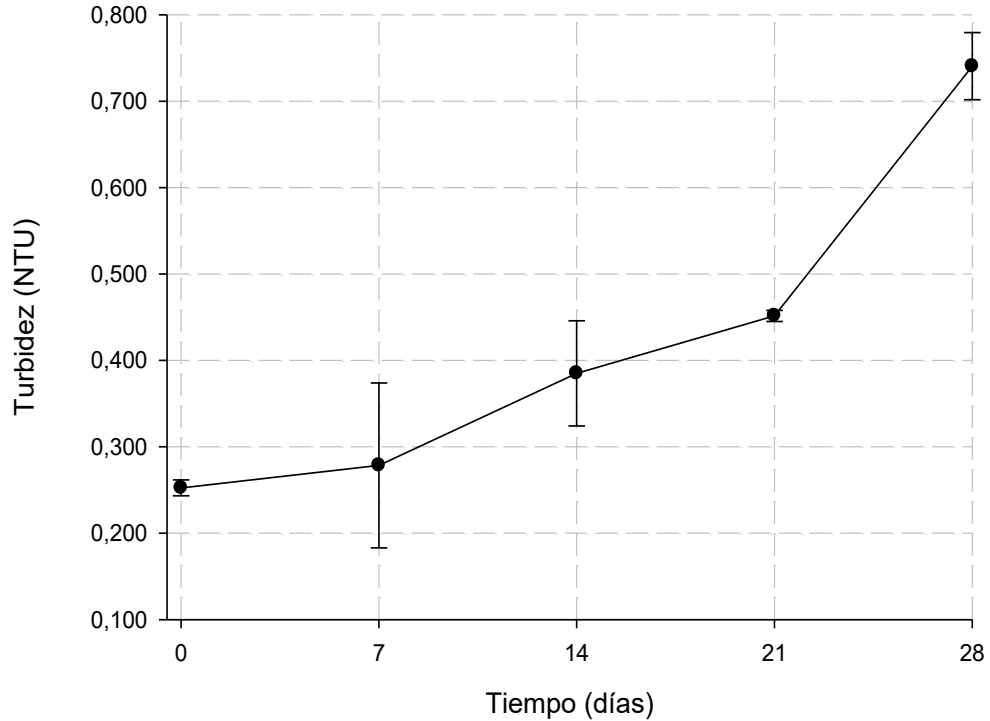


Figura 18. Turbidez promedio de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n= 2). Barras indican desviación estándar.

La turbidez en jugos, puede estar relacionada con crecimiento microbiano, actividad enzimática o degradación de componentes, como precipitación proteica. Dado lo anterior, se considera que éstas son las principales causas que podrían explicar el comportamiento observado, pues al transcurrir el tiempo de almacenamiento las reacciones químicas y enzimáticas suelen llevarse a cabo (Quesada, 2013; Salas, 2003).

Se observa que durante los 28 días el valor máximo de turbidez obtenido en el agua de pipa fue menor a 1 NTU, por lo que cumple con lo establecido según Cancino *et al.* (2004) para denominarse jugo clarificado, pues es menor a 5 NTU. Los resultados definitivos respecto a este parámetro se analizan en la sección 5.2.2.1.

5.1.2.7 Recuento total aerobio

Al evaluar el recuento total aerobio (RTA) del agua de pipa MFT+CUV, se observó un comportamiento similar al de la turbidez, pues el recuento aumenta a medida que transcurre el tiempo como lo evidencia la **Figura 19**. Lo anterior, indicaría que una de las razones del aumento en la turbidez se debe posiblemente a crecimiento microbiano (Salas, 2003; Vaillant *et al.*, 2008).

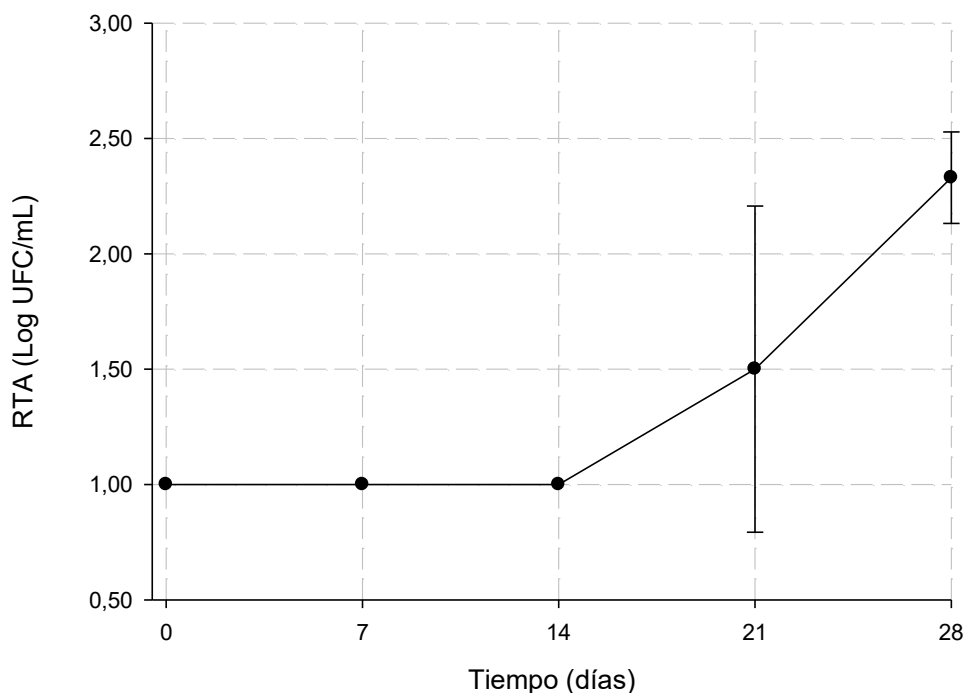


Figura 19. Recuento Total Aerobio (RTA) de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C. Datos expresados como promedio (n= 2). Barras indican desviación estándar.

La **Figura 19** muestra que para el día 21 y 28 de almacenamiento, se presentó una variabilidad considerable en las muestras analizadas, mientras que para los días anteriores, los recuentos se mantuvieron constantes entre réplicas del mismo día de estudio. Lo anterior parece mostrar que el proceso genera un producto con parámetros constantes hasta el día 14 de almacenamiento, por lo que se debe considerar este aspecto para evaluarlo durante las pruebas definitivas.

Los primeros días de almacenamiento, el RTA se mantiene menor a 10 UFC/mL, hasta el día 14. Se observa que para el día 28 de almacenamiento, no se ha sobrepasado el límite establecido de 3 log de bacterias aerobias para poder comercializar el agua de coco. Sin embargo, se considera de gran importancia controlar durante las pruebas definitivas la posible presencia de *E. coli* en la bebida (Rolle, 2007). Estos resultados se analizan en la sección 5.2.1.3.

5.1.2.8 Recuento de mohos y levaduras

El recuento de mohos y levaduras (RML) presentó un comportamiento similar al recuento total aerobio, pues demuestra una conducta creciente a medida que transcurre el tiempo, como se observa en la **Figura 20**.

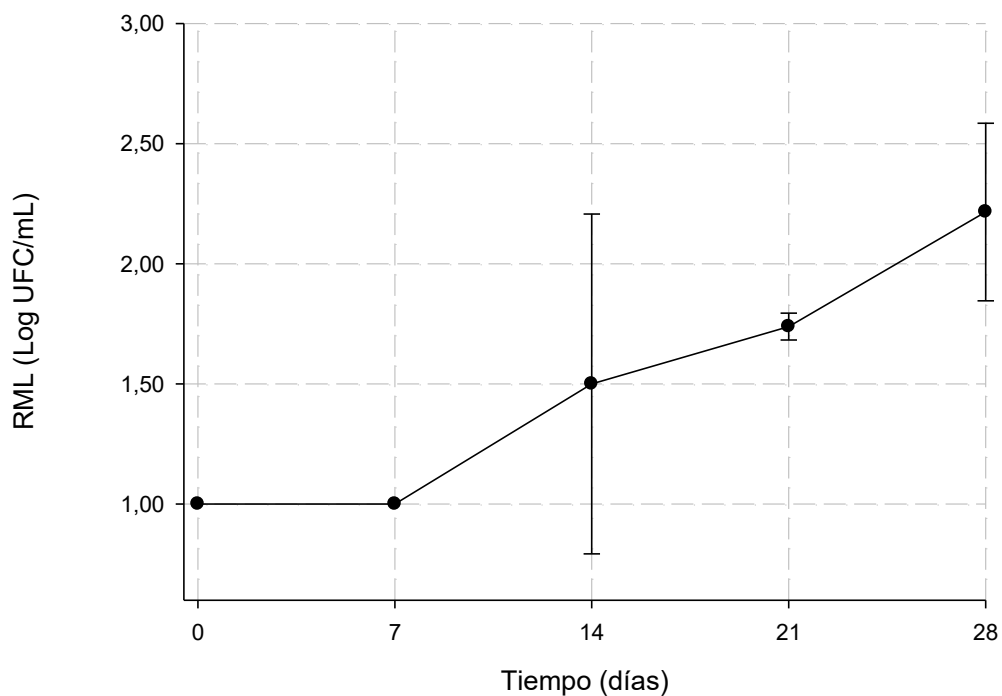


Figura 20. Recuento de Mohos y Levaduras (RML) de agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n= 2). Barras indican desviación estándar.

Los resultados respecto al RML cumplen con lo esperado de acuerdo con el comportamiento de la turbidez, pues como ya se mencionó, el incremento de la turbidez se puede relacionar con un crecimiento microbiano. Se observó en este caso, que hasta los primeros 7 días de almacenamiento, se presentaron recuentos menores a 10 UFC/mL. Se evidenció variabilidad en los recuentos de mohos y levaduras desde el día 14, alcanzando recuentos al día 28 menores a 3 log.

5.1.3 Desinfección de envases

5.1.3.1 Reducción logarítmica de *E. coli*

De acuerdo con el Reglamento Técnico Centroamericano, los jugos pasteurizados deben contar con un resultado menor a 3 NMP/mL para *E. coli* (COMEX *et al.*, 2009). Debido a las múltiples investigaciones, se ha comprobado que la MFT sustituye los tratamientos térmicos como la pasteurización. Con el fin de cumplir las disposiciones centroamericanas, los envases contenedores del agua de pipa no deben ser una posible fuente de contaminación (Walstra, 2005; Rolle, 2007; Wang, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010; Rai & Sirshendu, 2011).

La desinfección realizada a los envases cuenta con dos etapas: la primera corresponde a una desinfección con mayor concentración y la segunda a un enjuague con desinfectante en menor concentración. Se determinó la reducción logarítmica de *E. coli* lograda al realizar la segunda desinfección a una concentración de Y ppm por Z minutos. Según el Cuadro X, se observa que se realizó un estándar de *E. coli* con un recuento de 7 logaritmos, cumpliendo con la carga mínima recomendada para la preparación del inóculo (Hernández, 2006).

Al desinfectar los envases se obtiene una disminución promedio de $6,5 \pm 0,2$ logaritmos (ver Cuadro XI). Es importante mencionar que se realizó un estudio previo en el que se evidenció una carga promedio inicial en el RTA de 4 log de UFC/botella. Al obtener una reducción logarítmica mayor a este recuento, y tomando en cuenta que los envases utilizados se distribuyen y almacenan en condiciones higiénicas, se considera que la desinfección es efectiva para evitar el crecimiento de *E. coli* en el agua de pipa durante el almacenamiento. Diferentes autores indican que el CEN (Comité Europeo de Normalización) exige una reducción logarítmica de entre 3 - 5 log

en función de los microorganismos de ensayo, por lo que en este caso se logra superar este parámetro (Hernández, 2006; Soto *et al.*, 2012).

Cuadro X. Resultados obtenidos a partir del estándar Mc Farland realizado en la prueba de desinfección.

Muestra	Reporte (UFC/mL)	Reporte (UFC/ botella)
Estándar	8,1*	4,1*

Cuadro XI. Resultados de recuento de *E. coli* obtenidos en las botellas desinfectadas con *Desinfectante I*® a Y ppm durante Z minutos por inmersión.

Botella	Reporte (UFC/botella)	Reducción Logarítmica	*Reducción logarítmica promedio
1	Menos de 10	6,6	6,5±0,2
2	2,5* E	6,2 E	
3	Menos de 10	6,6	
4	Menos de 10	6,6	
5	Menos de 10	6,6	
6	Menos de 10	6,6	

*Datos expresados como promedio± intervalo de confianza al 95%.

Al contar los envases con una desinfección previa, en condiciones de concentración y tiempos más drásticas, se podría deducir que la reducción de carga de *E. coli* en los envases será mayor a la determinada en los ensayos realizados. Por lo anterior, se considera la desinfección como una etapa efectiva. Cabe destacar que el FDA ha considerado el uso de desinfectantes con ácido peracético como de alto nivel, y es recomendado por su amplio espectro de actividad, alta acción en presencia de materia orgánica y reducida toxicidad. Se ha permitido su uso en la industria de bebidas, frutas y hortalizas. Por lo anterior, se podría considerar que las condiciones de desinfección aplicadas posiblemente sean adecuadas para el almacenamiento del agua de pipa (Kunigk & Almeida, 2001; Hernández, 2006; Alvaro *et al.*, 2009; Kyanko *et al.*, 2010).

Otros autores han obtenido resultados distintos, de acuerdo con las matrices que desinfectan al utilizar ácido peracético. Wisniewsky *et al.* (2000) alcanzaron reducciones de 5 log de *E. coli* O157:H7, en manzanas frescas utilizando tiempos prolongados de 14 veces lo recomendado. Kunigk y Almeida (2001) estudiaron la reducción logarítmica de esta bacteria en superficies de contacto con alimentos, utilizando el ácido en una concentración de 60 ppm por 3,1 min, alcanzando una reducción de 8 ciclos logarítmicos, siendo mayor a la obtenida para los envases de agua de pipa. Sin embargo, este estudio se realizó en superficies lisas de acero inoxidable.

Resulta importante estudiar la reducción logarítmica lograda para los microorganismos de interés debido a que la efectividad de la desinfección depende de múltiples factores tales como temperatura, pH, dureza del agua, cantidad de materia orgánica presente, tiempo de contacto, tipo de material, entre otros (Neal *et al.*, 2011).

5.1.3.2 Prueba sensorial de diferencia

De acuerdo con Roessler *et al.* (1978), al realizar una prueba triangular con 20 panelistas, es necesario obtener 15 respuestas indicando correctamente la muestra distinta, para poder estimar con un 95% de confianza que verdaderamente detectan la muestra diferente. En este caso, como se observa en el Cuadro XII, se obtuvieron aciertos menores a esta cantidad, indicando que los panelistas no lograron identificar diferencias entre el agua de pipa envasada en botellas desinfectadas y botellas sin desinfectar.

Cuadro XII. Resultados obtenidos en la prueba triangular realizada para agua de pipa envasadas en botellas con y sin desinfectar.

Total de panelistas	Aciertos	Aciertos esperados ($\alpha=0.05$)	Proporción
20	7	15	0,35

Los resultados obtenidos en la prueba triangular cumplen con lo esperado, pues se ha establecido que los desinfectantes que poseen como agente activo ácido peracético, son muy convenientes para la desinfección de frutas, verduras y superficies en contacto con las mismas. Además, estos desinfectantes se consideran amigables con el ambiente pues poseen productos de descomposición totalmente biocompatibles, generando agua, oxígeno y ácido acético (Kunigk & Almeida, 2001; Hernández, 2006; Fernández, *et al.*, 2008; Alvaro *et al.*, 2009; Kyanko *et al.*, 2010).

Una desinfección efectiva en el área de producción de alimentos no solamente debe cumplir con reducciones microbiológicas específicas, sino que también debe generar alimentos aceptados por el consumidor. Debido a que a una concentración de Y ppm del desinfectante se presentó una disminución logarítmica de *E. coli* de $6,5 \pm 0,2$ y no se detectaron diferencias por parte de los panelistas en el agua de pipa debido a la desinfección, se consideró que estas condiciones resultaron promisorias para la conservación del producto (Hernández, 2006; Neal *et al.*, 2011).

5.2 Pruebas definitivas

5.2.1 Estudio de almacenamiento del agua de pipa

Durante el estudio de almacenamiento definitivo, se analizaron parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales, comparando el agua de pipa envasada en la salida de permeado (MFT) y el agua de pipa envasada en la cámara con luz UV (MFT + CUV).

5.2.1.1 Turbidez

Los resultados obtenidos respecto a la turbidez del agua de pipa tanto al microfiltrar (MFT) como al microfiltrar y envasar con la cámara con luz UV (MFT+CUV) se pueden observar en la **Figura 21**. Con un 95% de confianza se puede decir que hay diferencias significativas en los valores de turbidez del agua de pipa obtenida mediante microfiltración con respecto al producto obtenido mediante microfiltración y envasado en la cámara con luz UV ($p < 0,0001$). El análisis de varianza realizado se detalla en la sección 8.2.

Se observaron valores menores de turbidez cuando solamente se microfiltra. Durante los primeros 7 días de almacenamiento, con ambos métodos de envasado se presentaron valores de turbidez menores a 1,00 NTU; posteriormente, la turbidez en las muestras MFT+CUV empezó a aumentar, mientras que para el caso de las muestras MFT, la turbidez promedio se mantuvo relativamente constante, hasta el día 42, que alcanzó un valor promedio de 1,94 NTU.

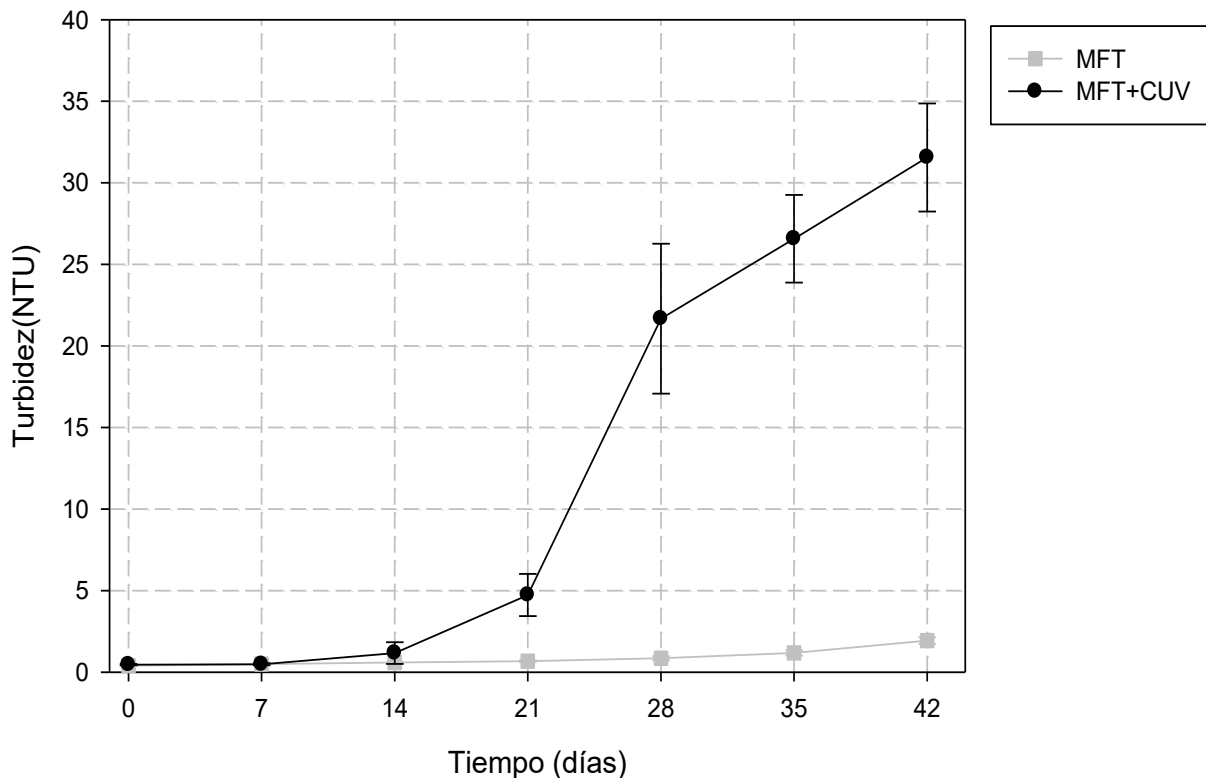


Figura 21. Turbidez promedio de agua de pipa MFT y agua de pipa MFT + CUV respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n=9) Barras indican intervalo de confianza al 95%.

Se observó que el tiempo tiene un efecto significativo sobre los valores de turbidez del agua de pipa ($p < 0,0001$) y se evidenció también que hay una interacción entre el tiempo y el tipo de envasado; esto representa que el tiempo y el tipo de envasado no son independientes sobre el valor de turbidez obtenido. Dado lo anterior, las muestras de agua de pipa con distinto sistema de envasado, no poseen la misma tendencia en la turbidez a través del tiempo. Se observó también que la turbidez entre distintos lotes de materia prima, no presentó diferencias significativas ($p = 0,43$).

Para las muestras MFT, se obtuvieron valores de turbidez con menor desviación estándar al procesar 3 lotes distintos, mientras que para el caso de las muestras MFT+CUV se determinaron valores de turbidez más variables. Dado lo anterior, se podría decir que el método de envasado más promisorio, evaluando la turbidez, sería solamente aplicar MFT, lo anterior debido a que

permite generar un producto con valores menores de turbidez por mayor cantidad de tiempo, obteniendo además valores con menor variabilidad con respecto a las muestras envasadas en la cámara de luz UV.

Los valores de turbidez para jugos clarificados presentan valores menores a 5,0 NTU, cumpliéndose este parámetro durante el tiempo de almacenamiento para el agua de pipa MFT. El agua de pipa MFT + CUV sobrepasó este límite de turbidez el día 28 de almacenamiento. La microfiltración permite la remoción de partículas causantes de turbidez, por lo que en este caso se demuestra que el agua de pipa MFT + CUV presentó una recontaminación posterior a la etapa de microfiltración. Se puede comprobar la recontaminación al observar los recuentos microbiológicos, tanto aerobios totales como los de mohos y levaduras obtenidos para estas muestras (ver **Figura 22** y **Figura 23**) (Cancino *et al.*, 2004).

5.2.1.2 Recuento de mohos y levaduras (RML)

El recuento de mohos y levaduras durante el tiempo para las muestras MFT y las muestras MFT+ CUV se puede observar en la **Figura 22**. Se evidenciaron mayores recuentos en las muestras MFT+CUV ($p < 0,0001$); para este caso, los recuentos de mohos y levaduras empezaron a crecer hasta alcanzar un valor logarítmico promedio de 6,55 UFC/mL en el día 28 de almacenamiento (Hernández, 2003).

Debido al desarrollo de estos microorganismos, se presentaron características sensoriales indeseables en el agua de pipa MFT+CUV, tales como: mal sabor, mal olor, mal aspecto, turbidez, entre otros. Además con un crecimiento microbiano tan elevado no se recomienda el consumo del producto (Pascual & Calderón, 2000; Hernández, 2003; Tournas *et al.*, 2011).

En el caso de las muestras MFT, éstas mostraron recuentos menores durante el tiempo, presentando durante todo el proceso un valor logarítmico promedio de 1,27 UFC/mL, lo que hace que sea apta para el consumo hasta el día 42 de almacenamiento, tomando en cuenta solamente el aspecto microbiológico (Pascual & Calderón, 2000; Hernández, 2003).

Según el análisis estadístico realizado (ver sección 8.2) se evidenció que el tiempo tiene un efecto en el recuento de mohos y levaduras ($P < 0,0001$). En ese caso, también se observó una

interacción tiempo*tipo de envasado significativa ($P < 0,0001$), lo que evidencia que el RML a través del tiempo depende del tipo de envasado realizado. Además, se encontró que el recuento de mohos y levaduras no presentó diferencias significativas entre muestras del mismo lote ($p = 0,52$).

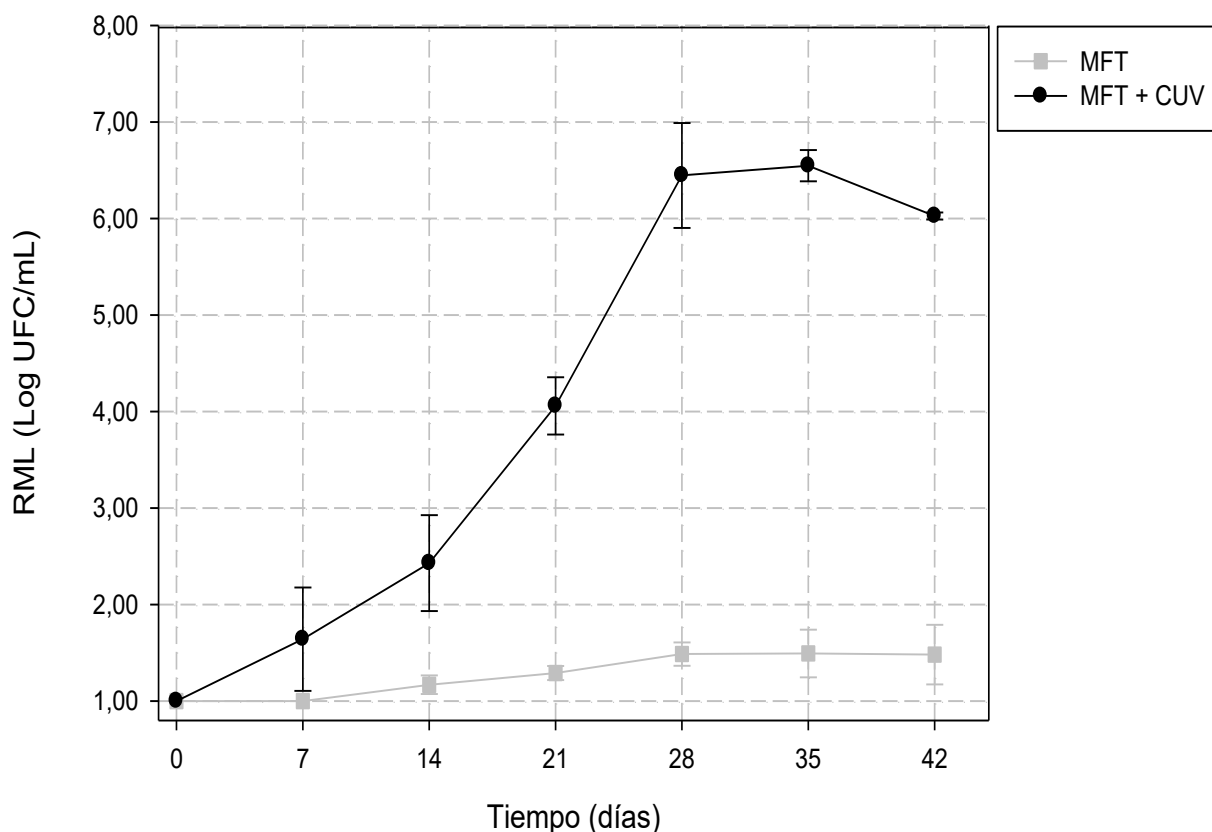


Figura 22. Recuento logarítmico de mohos y levaduras presentes en agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada-ensvasada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio ($n=9$). Barras indican intervalo de confianza al 95%.

Los mohos y levaduras desarrollados durante el almacenamiento, presentaron estructuras y morfologías diversas como es de esperarse en una matriz rica en nutrientes. En el caso de las muestras MFT+CUV estos microorganismos podían observarse a simple vista. Se considera que se presentó desarrollo tanto de mohos como de levaduras, pues según la literatura, el crecimiento de mohos en alimentos se reconoce fácilmente por su aspecto aterciopelado y algodonoso. Mientras

que las levaduras, son hongos que crecen en forma de agregados que pueden ser globosos, ovoides, piriformes, alargados o casi cilíndricos. Ambas estructuras se evidenciaron en las muestras MFT+CUV (Pascual & Calderón, 2000; Tournas *et al.*, 2011).

Se consideró entonces que las muestras MFT+CUV no eran adecuadas para el consumo humano pues los mohos y levaduras en estas cantidades actúan sobre los alimentos causando deterioro nutricional y sensorial, además de la posibilidad de generar reacciones alérgicas, patógenas y tóxicas. Por lo general, el consumo de levaduras en los seres humanos resulta de menor importancia respecto al consumo de mohos, pues estos últimos son capaces de producir micotoxinas, compuestos químicos con propiedades cancerígenas (Miller, 2002; Méndez & Moreno, 2009; Brera *et al.*, 2012).

5.2.1.3 Recuento total aerobio (RTA)

Se analizó también el recuento total aerobio (RTA) presente en el producto durante el tiempo de almacenamiento. En este caso, se obtuvieron resultados similares a los mostrados para los recuentos de mohos y levaduras (ver sección 8.2). Las muestras MFT+CUV presentaron recuentos logarítmicos significativamente mayores que las muestras MFT ($p < 0,0001$). Las muestras MFT+CUV desarrollaron un crecimiento bacteriano con mayor rapidez y con más variabilidad entre los lotes analizados en comparación con las muestras MFT (ver **Figura 23**).

Se evidenció que el factor tiempo tuvo un efecto significativo sobre los recuentos aerobios totales ($p < 0,0001$). Para las muestras MFT+CUV se presentó un comportamiento bacteriano semejante al obtenido para los mohos y levaduras. La FAO ha establecido un límite de bacterias aerobias totales de UFC/mL para el consumo de agua de pipa; se determinó que este parámetro se cumple para el caso del producto MFT durante todos los tiempos analizados, mientras que para las muestras MFT+CUV se sobrepasa el límite el día 14 de almacenamiento, pues se cuenta con un recuento logarítmico promedio de 3, 20 UFC/mL. Dado lo anterior, el agua de pipa MFT+CUV no podría ser consumible ni comercializable en este momento (Rolle, 2007).

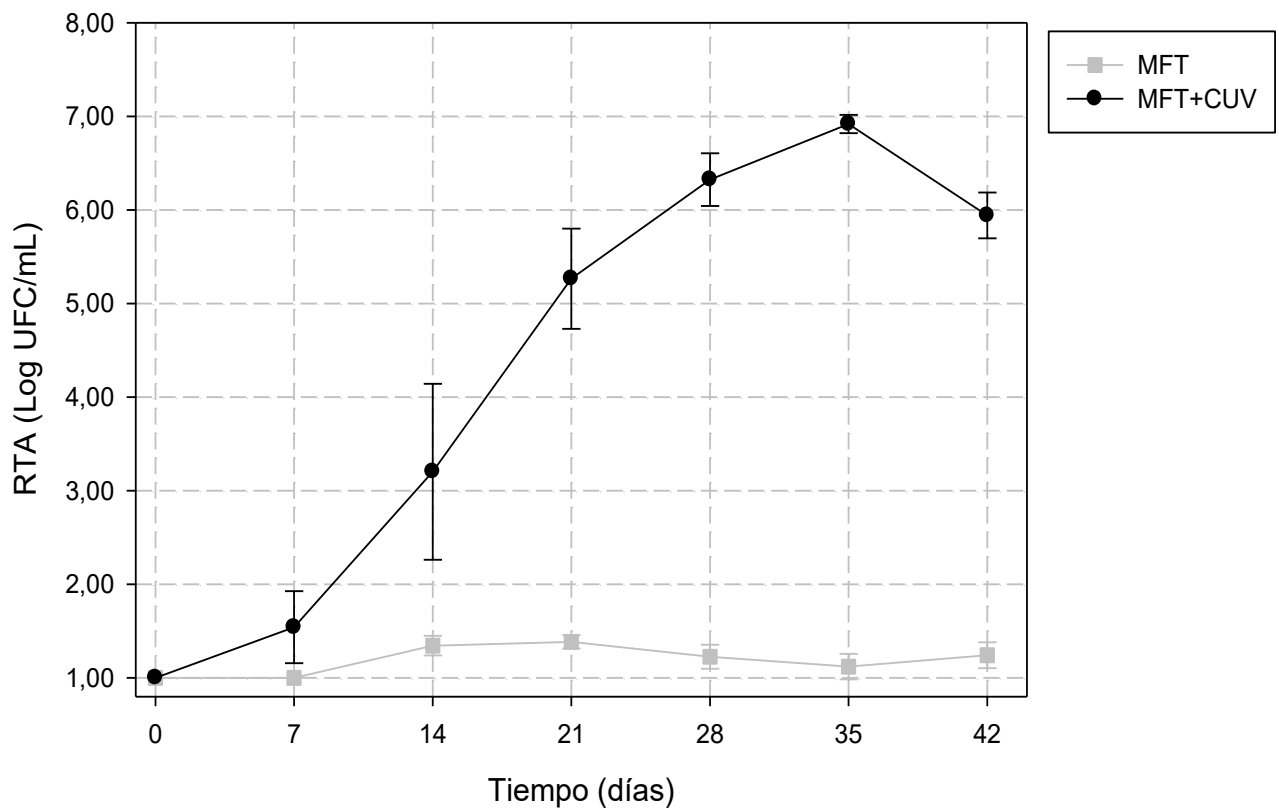


Figura 23. Recuento Total Aerobio (RTA) presente en agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada-ensada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n=9). Barras indican intervalo de confianza al 95%.

De acuerdo con los resultados, se estableció que no hay diferencia significativa en el RTA al comparar los 3 lotes de materia prima utilizada ($p=0,060$). La interacción tiempo- tipo de envasado fue significativa ($p < 0,0001$) por lo que se dice nuevamente que el efecto del tiempo depende del tipo de envasado (MFT o MFT + CUV) que se aplique durante el proceso de microfiltración de agua de pipa.

Al igual que para la turbidez y los recuentos de mohos y levaduras, se observó una mayor variabilidad en los resultados en las muestras MFT + CUV respecto a las MFT; lo anterior puede deberse a que la cámara posee un foco de contaminación en alguna zona de la tubería y al envasar no necesariamente la contaminación es constante en cada botella llenada.

De acuerdo con los resultados de RML y los de RTA se puede decir que el agua de pipa obtenida con MFT + CUV no resulta consumible ya que representaría un potencial riesgo para el consumidor. Mientras que el agua solamente MFT cuenta con valores microbiológicos aceptables. Se considera que la cámara de luz UV representó un foco de contaminación del producto posterior al proceso de MFT, lo cual podría deberse a que la desinfección química aplicada no resultó suficiente para eliminar las fuentes de contaminación. Se ha demostrado, que los mejores métodos de limpieza son aquellos en los que se logra aplicar tratamientos térmicos que permiten la esterilización. Otra opción es contar con equipos o sistemas que favorezcan la limpieza CIP, la cual gracias a agentes químicos y a la turbulencia generada, logra una desinfección y limpieza efectiva (Lizcano *et al.*, 2009).

Con el fin de asegurar que el agua de pipa MFT representa un producto inocuo para los consumidores se determinó por duplicado la prueba de NMP para *E. coli*, obteniendo para ambas muestras valores de > 3 NMP/mL, lo anterior significó que el producto cumplió con el RTCA 67.04.50:08 (ver Cuadro III). A las bacterias desarrolladas en el agua de pipa MFT+CUV se les realizó una tinción de Gram, obteniendo morfologías múltiples (ver **Figura 24**). Se observó el desarrollo principalmente de bacilos Gram negativos y en menor cantidad se observaron cocos y bacilos Gram positivos. Para identificar específicamente las bacterias desarrolladas, se deben realizar pruebas más específicas, sin embargo, esto no se realizó ya que no representaba un objetivo de interés para el estudio. Es importante considerar en este caso que la mayoría de bacterias Gram negativas pueden ser patógenas (Pascual & Calderón, 2000; Tournas *et al.*, 2011).

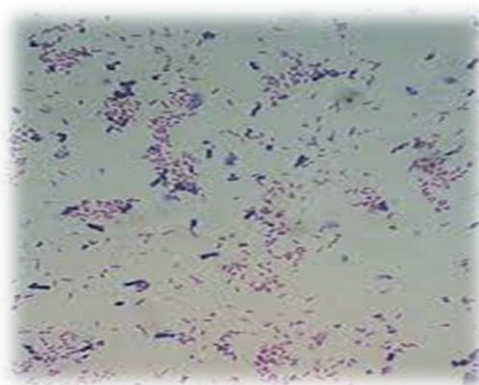


Figura 24. Tinción de Gram de agua de pipa MFT+ CUV.

5.2.1.4 Cambio de color (ΔE)

Se analizó el cambio de color (ΔE) del agua de pipa durante el tiempo. Se observó que se presentaron mayores cambios de color en el tratamiento MFT + CUV, en comparación a las muestras MFT como se evidencia en el Cuadro XIII. Según la literatura, existen diferentes valores establecidos de ΔE que indican cambios de color visibles al ojo humano, como ya se mencionó anteriormente. En este caso, se obtuvieron valores mayores a 2,0 como parámetro determinante para indicar cambios de color notorios en el producto. En el día 21 de almacenamiento se sobrepasó este valor para el caso de las muestras MFT + CUV, mientras que para el agua de pipa MFT se alcanzó un valor de ΔE mayor a 2 hasta el día 42 de almacenamiento.

Cuadro XIII. Cambio de color presentado en agua de pipa microfiltrada (MFT) y microfiltrada-
envasada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C.

Tratamiento	Tiempo (días)	ΔE *
MFT	7	0,4 ± 0,4
	14	0,5 ± 0,3
	21	0,5 ± 0,5
	28	0,7 ± 0,3
	35	0,7 ± 0,5
	42	2,2 ± 0,2
MFT + CUV	7	0,4 ± 0,3
	14	0,9 ± 0,8
	21	2 ± 1
	28	4 ± 2
	35	4 ± 1
	42	5 (1)

*Datos expresados como promedio (n= 9) ± intervalo de confianza al 95%.

Los cambios de color pueden deberse a actividad enzimática, crecimiento microbiano o degradación de componentes. Dado lo anterior, obtener mayores cambios de color en las muestras MFT+CUV es de esperarse, pues cuentan con mayores valores de turbidez y carga microbiana (Cancino *et al.*, 2004; Prades *et al.*, 2012).

5.2.1.5 pH

Se determinó el valor del pH de las diferentes muestras de agua de pipa, encontrando que el pH del agua de pipa varió según el lote analizado ($p < 0,05$) (ver sección 8.2). Lo anterior se puede deber a la variabilidad de la materia prima, ya que el pH del agua de pipa puede verse afectado por diferentes factores, principalmente por la madurez del fruto, las condiciones de cultivo y variedad de la pipa. Nuevamente se obtuvo una interacción del tiempo- tipo de envasado significativa ($p = 0,0051$), indicando que el valor del pH a través del tiempo depende del tipo de envasado realizado (Prades *et al.*, 2012).

En este caso, no se observó un comportamiento claro en la tendencia del pH durante el tiempo, por lo que se realizó un análisis de regresión lineal, estableciendo una ecuación asociada a esta variable. Es importante mencionar que este análisis no se realizó para las demás variables físico-químicas, debido a que el comportamiento de los otros parámetros mostró una tendencia clara durante el tiempo, además que no se pretendió predecir la vida útil del producto mediante la regresión lineal. El comportamiento del pH durante el tiempo se muestra en la **Figura 25**.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la ecuación asociada a las muestras MFT+CUV demostró que el pH disminuyó durante el tiempo ($p = 0,0008$) y podría relacionarse con la presencia de microorganismos causantes de acidez en el producto. Para las muestras MFT, el pH no cambió significativamente durante el tiempo ($p = 0,578$).

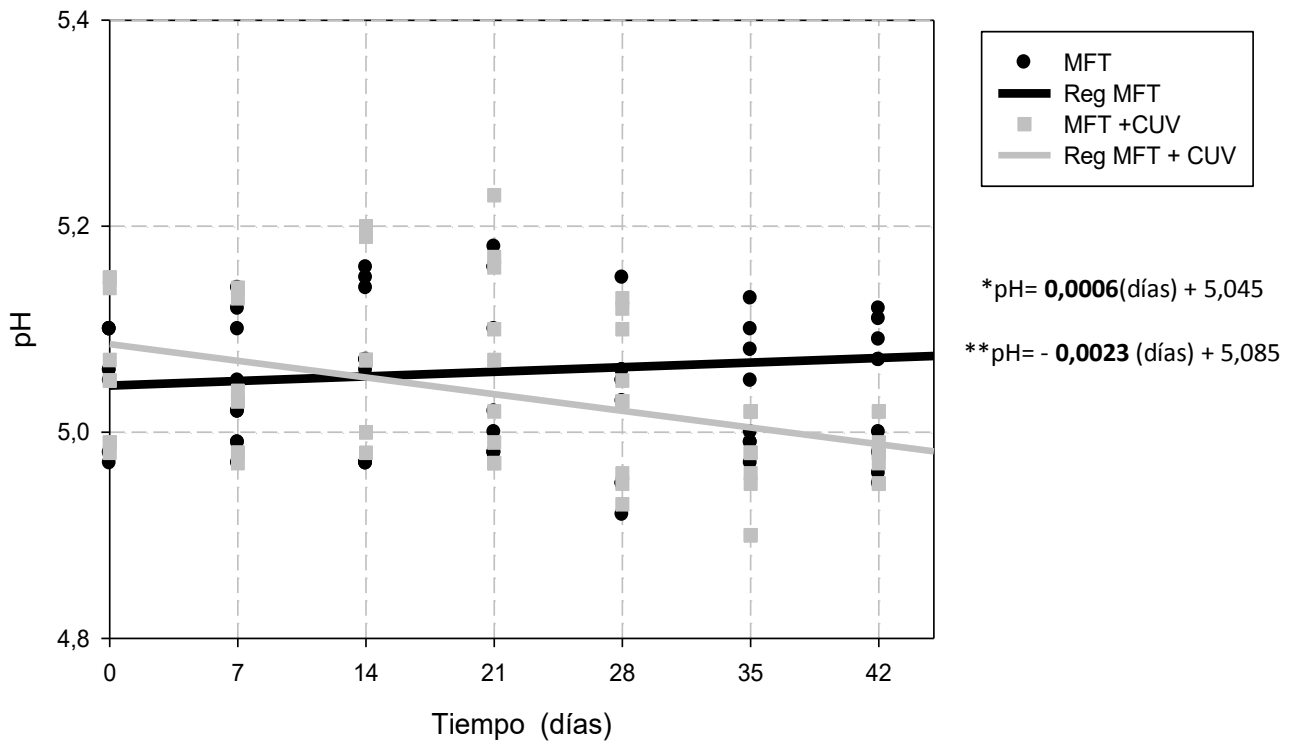


Figura 25. pH de agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada-ensavada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. (n= 9). *Ecuación asociada al pH del agua de pipa MFT durante el tiempo. ** Ecuación asociada al pH del agua de pipa MFT+CUV durante el tiempo.

El valor del pH del agua de pipa MFT+CUV cambió durante el tiempo de almacenamiento de 5,06 a 4,98. En este caso, a pesar de que se presentaron diferencias significativas en el pH del agua de pipa, se consideró nuevamente, al igual que en las pruebas preliminares, que las variaciones de este parámetro son pequeñas y no serían percibidas por el consumidor. Además de acuerdo con distintas investigaciones realizadas, el pH del agua de pipa puede rondar de 4,0 a 6,5; por ello se considera un valor aceptable para este parámetro (Prades *et al.*, 2012).

5.2.1.6 Sólidos solubles

El comportamiento de los sólidos solubles del agua de pipa también se evaluó midiendo los Brix durante el tiempo de almacenamiento. Los resultados se pueden observar en la **Figura 26**. Se logró evidenciar que el tiempo tuvo un efecto significativo sobre el contenido de sólidos solubles de las diferentes muestras de agua de pipa ($p = 0,001$). El análisis de varianza realizado se puede observar en la sección 8.2.

Se observa que los sólidos solubles promedio fueron significativamente mayores ($p < 0,001$) cuando solamente se envasó el agua de pipa directamente después del proceso de MFT, debido posiblemente al consumo de sólidos solubles producto del crecimiento microbiano en las muestras envasadas en la cámara con luz UV (Cancino *et al.*, 2004). Con ambos métodos de envasado, se logró mantener valores de sólidos solubles (Brix) mayores a 5,0 por lo que se cumplió con lo establecido por la FAO con respecto a este parámetro (Rolle, 2007).

El comportamiento observado en la **Figura 26** no cumplió con la tendencia mostrada en las pruebas preliminares, donde no se modificaron los sólidos solubles durante el tiempo. Sin embargo, distintos estudios en otras matrices indican que ambos comportamientos pueden presentarse, como en el caso del fruto butiá (*Butia capitata*, Mart. Beec.) que en almacenamiento en refrigeración durante 28 días presentó una disminución en los sólidos solubles de 4,0 °Brix. Para jugo de curuba (*Passiflora mllissima* Bailey) se presentó una disminución en los sólidos solubles desde el día 19 de almacenamiento. Según varios autores esta disminución puede deberse al deterioro del producto y modificaciones celulares (Telez *et al.*, 1999; Zaccari *et al.*, 2004).

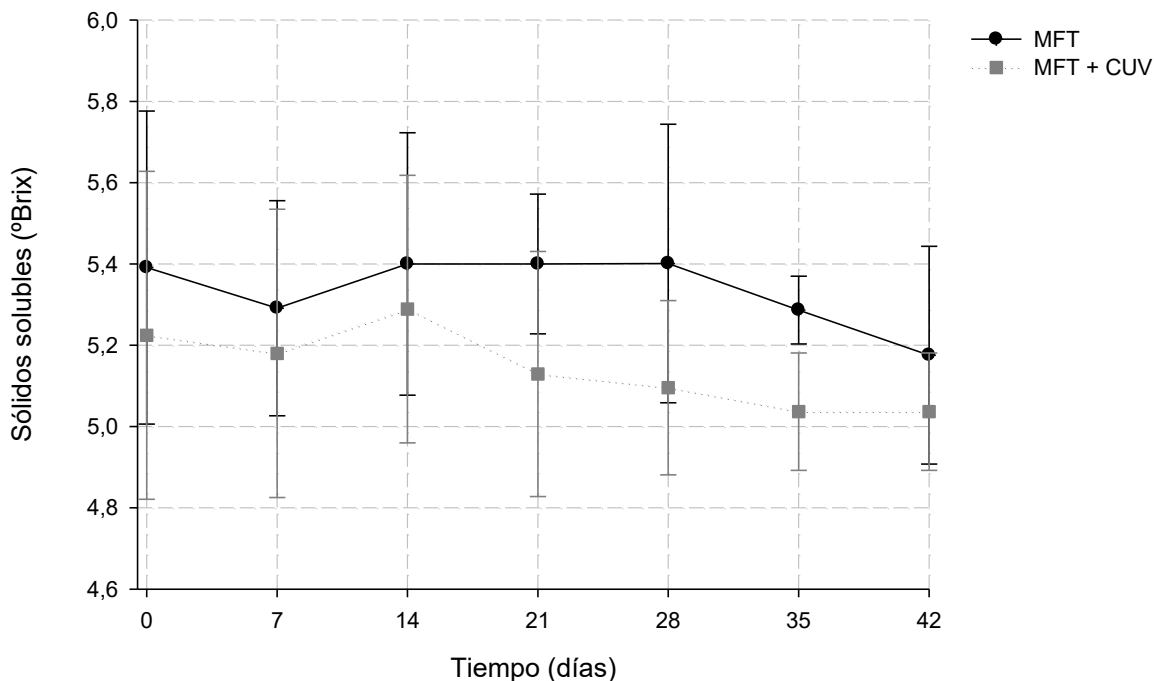


Figura 26. Sólidos solubles (°Brix) del agua de pipa microfiltrada (MFT) y agua de pipa microfiltrada-ensada en cámara con luz UV (MFT + CUV) respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Datos expresados como promedio (n=9). Barras indican intervalo de confianza al 95%.

5.2.2 Evaluación de distintos materiales de empaque

Los materiales de empaque utilizados para alimentos son determinantes en la vida útil de los productos. En este caso, debido a que se comprobó que aún con la MFT existe una actividad enzimática que puede llegar a deteriorar el producto, se consideró utilizar otro material de empaque que disminuyera la presencia de oxígeno y permitiera una mejor conservación del agua de pipa (Anzueto, 1991; Tso, 2010; Prades *et al.*, 2012).

Además, contemplando que el parámetro microbiológico más estricto es un resultado menor a 3 NMP/mL de *E. coli*, se realizó este análisis para muestras de agua de pipa MFT y almacenadas durante el tiempo. Los resultados se muestran en el Cuadro XIV (COMEX *et al.*, 2009).

Cuadro XIV. Evaluación de *E. coli* en agua de pipa MFT con 30 días de almacenamiento a 4 °C utilizando distintos materiales de empaque.

Tipo de empaque	Capacidad (mL)	<i>E. coli</i> (NMP/mL)	Permeabilidad $P \times 10^{11}$ (mL cm sec ⁻¹)
PEAD	1000	< 3	11
Vidrio	500	< 3	0,0
PET	250	< 3	0,22

PEAD: Polietileno de alta densidad; PET: Tereftalato de polietileno.*Permeabilidad al oxígeno a 30°C. Fuente: Krochta, 2007.

Se logró determinar que con todos los materiales de empaque evaluados se cumplió con el parámetro establecido respecto a *E. coli*. Se observaron las características sensoriales al utilizar los diferentes empaques, por lo que es importante considerar dos aspectos al decidir procesar el producto a escala industrial: los costos y el agrado del consumidor (Tso, 2010; Prades *et al.*, 2012).

Al comparar las características sensoriales del agua de pipa con los distintos empaques, se determinó que tanto el vidrio como el PET permitían conservar las características sensoriales de mejor manera, pues se percibía como un producto más fresco y natural, de acuerdo con la percepción en un panel sensorial informal. Además el agua de pipa envasada en PEAD presentó un sabor oxidado leve en los últimos días de almacenamiento (28 días), el cual no fue percibido con los demás envases. En el agua de pipa envasada tanto vidrio como en PET, se observaron adecuadas características sensoriales hasta el día 42 de almacenamiento, conservando su aroma, sabor y frescura.

La protección de los alimentos de los gases y vapores que están presentan en el ambiente depende de la integridad del empaque incluyendo el sellado y el cierre, y sobre todo de la permeabilidad del material del empaque. Los gases pueden permearse o atravesar los materiales de los envases por los microscópicos poros y pequeños orificios. Las diferencias en las características sensoriales en el agua de pipa, al utilizar diferentes envases, puede deberse a que el material de empaque presenta diferente permeabilidad al oxígeno. La permeabilidad de un compuesto o elemento está relacionada con la capacidad de ingreso y salida de éste a través del envase (Coles *et al.*, 2003; Sandoval, 2009).

Se ha determinado que el oxígeno es un agente oxidante que favorece el deterioro del agua de pipa, por lo que lo más recomendado es utilizar un empaque con menor permeabilidad a

este componente (Prades *et al.*, 2012). En el Cuadro XIV se observan los valores de permeabilidad para los envases utilizados, donde se evidencia que el vidrio presenta la menor permeabilidad a este elemento, seguido del PET y por último el PEAD.

La permeabilidad de un componente determinado va a depender del tamaño y forma del envase, de la temperatura de almacenamiento, del tipo de polímero utilizado y del uso de aditivos para polímeros. Todos estos factores deben considerarse al seleccionar el envase de un alimento. En el caso del agua de pipa se considera que el elemento crítico a considerar es el oxígeno, sin embargo, en otros alimentos se podrían considerar otros gases como aromas (Coles *et al.*, 2003; Krochta, 2007, Sandoval, 2009).

De acuerdo con los resultados anteriores, se recomendaría utilizar vidrio para envasar el agua de pipa. Sin embargo es importante considerar otros factores. El vidrio es un material pesado y frágil, lo cual puede presentar complicaciones en el transporte y exportación del producto. Además su costo es mayor respecto a la compra de la mayoría de polímeros plásticos. Contemplando que el envase de PET generó buenos resultados en la conservación del agua de pipa, es más barato y cómodo de transportar, se decidió que es el envase más promisorio para comercializar el agua de pipa.

5.2.3 Evaluación de la MFT en agua de pipa sobre las propiedades sensoriales durante el almacenamiento

5.2.3.1 Análisis sensorial descriptivo

Las pruebas sensoriales fueron realizadas con agua de pipa únicamente microfiltrada, pues ya se mencionó que las muestras microfiltradas y envasadas en la cámara con luz UV presentaron características microbiológicas y sensoriales que impidieron su consumo. Al evaluar las muestras de agua de pipa microfiltrada, con panelistas entrenados en el uso de escalas de intensidad, se contemplaron dos descriptores considerados como los principales atributos presentes en el deterioro sensorial del producto: sabor agrio y turbidez. En el Cuadro XV se muestran los resultados del análisis estadístico realizado para el sabor agrio. Se puede observar que hay diferencias significativas en las muestras, por lo que se realizó una prueba de comparación de medias para saber de forma estadística cuáles muestras eran diferentes entre sí.

Según los resultados obtenidos en el Cuadro XV, se observa que la muestra del día 42 de almacenamiento presentó un sabor agrio más intenso respecto a las demás ($p < 0,05$). Según los panelistas, las muestras desde el día 0 hasta el día 35 de almacenamiento presentan valores de sabor agrio semejantes entre sí y con promedios bajos. El análisis de varianza realizado se puede observar en la sección 8.3.

Cuadro XV. Valores promedio de intensidad de sabor agrio para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Tiempo (días)	Promedio Intensidad sabor agrio
0	1,67 ^a
7	1,80 ^a
14	1,95 ^a
21	2,47 ^a
28	2,71 ^a
35	2,77 ^a
42	5,60 ^b

Valores expresados como promedio (n=24) con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$)

Al realizar la misma evaluación para el descriptor de turbidez, se obtienen resultados similares a los indicados para el sabor agrio, pues se detectaron diferencias significativas entre las muestras de acuerdo al ANDEVA realizado, como se observa en el Cuadro XVI. Los panelistas encontraron que la muestra de agua de pipa del día 42 de almacenamiento era significativamente más turbia a las demás muestras ($p < 0,05$). Se evidenció que los panelistas calificaron las muestras con valores bajos de turbidez como era de esperarse para un jugo microfiltrado. Los resultados del análisis de varianza realizado se pueden observar en la sección 8.3.

Cuadro XVI. Valores promedio de intensidad de turbidez para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo

Tiempo (días)	Promedio Intensidad turbidez
0	1,67 ^a
7	0,38 ^a
14	0,46 ^a
21	0,25 ^a
28	0,58 ^a
35	0,68 ^a
42	3,11 ^b

Valores expresados como promedio (n=24) con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).

Se encontró entonces que el promedio de la intensidad de la turbidez en las muestras se mantiene sensorialmente constante hasta el día 35 de almacenamiento. Los valores de intensidad caracterizan el deterioro sensorial del agua de pipa, permitiendo describir que la turbidez y el sabor agrio se perciben por los panelistas en las mismas condiciones de tiempo. Una posible razón que explica este comportamiento es que estos parámetros sensoriales pueden estar relacionados con la actividad enzimática, observándose que a medida que transcurren las reacciones enzimáticas a través del tiempo, se incrementan tanto la turbidez como el sabor agrio (Hough & Fiszman 2005).

5.2.3.2 Pruebas de agrado

De acuerdo con la prueba de agrado realizada por los consumidores de agua de pipa se encontró que existían diferencias significativas entre las muestras de agua de pipa como se evidencia en el Cuadro XVII. Se realizó el panel de agrado con 95 consumidores de agua de pipa, siendo un 54% mujeres y un 46% hombres.

Cuadro XVII. Valores promedio de agrado para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Tiempo (días)	Valor promedio de agrado
0	6,33 ^a
7	6,24 ^a
14	6,19 ^a
21	5,56 ^a
28	4,54 ^b
35	3,32 ^c
42	2,72 ^c

Valores expresados como promedio (n=95) con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).

Según los valores obtenidos, se puede decir que el agrado del producto fue calificado de igual manera hasta el día 21 de almacenamiento. En los días 28, 35 y 42 el agrado por el producto disminuyó. Se puede observar también que el agrado fue menor para los días 35 y 42 de almacenamiento, respecto al día 28 ($p < 0,05$). Dado lo anterior y tomando en cuenta los resultados mostrados en los Cuadros XV y XVI, se podría decir que el producto presentó cambios sensoriales en agrado al día 28 de almacenamiento. Contemplando que el producto debe contar con una calidad y agrado por el consumidor constante durante su vida útil, se debe considerar reportar una vida útil menor al parámetro determinado durante las pruebas sensoriales con consumidores (Hough & Fiszman 2005).

De acuerdo con otros autores, al realizar procesos de MFT con jugos de frutas, se han alcanzado valores de vida útil aún mayores, como lo es para el caso de la piña (*Ananus comosus* L. Merr.), logrando una vida útil de 3 meses, al igual que para el jugo de manzana (*Malus domestica*) y rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L). Para el caso de la piña y manzana se realizaron tratamientos enzimáticos para disminuir la viscosidad y dar estabilidad a los jugos, y se envasó directamente en botellas de vidrio, en condiciones asépticas dentro de una cámara con flujo laminar. En la investigación con rosa de jamaica, no se aplicó ningún tratamiento enzimático, se almacenó en recipientes estériles de vidrio y se envasó en un sistema cerrado (Castro & Xavier, 2009; Cisse *et al.*, 2011; Laorko *et al.*, 2013).

Por lo que nuevamente se observa que la disminución de la actividad enzimática en estos procesos es un factor determinante para la vida útil; además se evidencia que el vidrio es una buena opción para la conservación de los jugos con este tipo de procesamiento. En otros casos, se ha logrado mantener la calidad del producto por menos tiempo, al igual que en el presente estudio (Castro & Xavier, 2009; Cisse *et al.*, 2011; Laorko *et al.*, 2013).

Las causas más comunes de deterioro durante el almacenamiento están relacionadas con el pardeamiento tanto enzimático como no enzimático. Para el caso del agua de pipa se considera que la actividad enzimática residual fue la causante del deterioro. Para disminuir dicha actividad, se podría entonces adicionar mayor cantidad de ácido ascórbico, realizar un tratamiento térmico, o mejorar la barrera de ingreso de oxígeno. La primera opción no se llevó a cabo por la presencia de sabores metálicos en el producto; la segunda causaría la disminución de propiedades nutricionales deseadas en el jugo y podría generar coloraciones rosadas (Montero, 2008; Muthukumarappan & Marella, 2010; Romero, 2010; Rai & Sirshendu, 2011).

Para lograr disminuir el ingreso de oxígeno al producto, es recomendable utilizar un empaque menos permeable al oxígeno. Se consideró que sería una opción efectiva, pues de acuerdo con los resultados expuestos en la sección 5.2.2, se evidenció que los envases de PET permitieron conservar de mejor manera las propiedades sensoriales del agua de pipa.

5.2.4 Evaluación del desempeño de la microfiltración tangencial del agua de pipa

Durante los ensayos de evaluación de flujos de permeado del agua de pipa se observaron valores variables entre las pruebas. Estas diferencias pueden estar asociadas a las características de la materia prima empleada durante los ensayos, ya que factores como la madurez y variedad de las pipas utilizadas pueden generar diferencias en las propiedades físico-químicas del agua de pipa. Dado lo anterior, se analizaron las características físico-químicas asociadas a la materia prima. Los resultados se muestran en el Cuadro XVIII.

Otro aspecto que puede influir en los flujos de permeado son las diferencias en los valores de permeabilidad de la membrana durante cada ensayo, pues la membrana se encontraba con distintos grados de colmatación para las pruebas (Chaverri, 2003; Montero, 2008).

Cuadro XVIII. Características físico-químicas del agua de pipa utilizada como materia prima para la evaluación de los flujos de permeado durante la microfiltración tangencial.

Prueba	*pH	*Sólidos solubles (Brix)	*Turbidez (NTU)	Flujo permeado promedio (L/hm ²)	FRV óptimo	Rendimiento (%)
1	4,94 ± 0,05	5,6 ± 0,0	8,8 ± 0,6	348,69	30-40	96,6-97,5
2	5,02 ± 0,08	5,6 ± 0,0	7 ± 1	353,31		
3	5,05 ± 0,09	5,5 ± 0,0	48 ± 2	205,94	20-30	95,0-96,6
4	4,94 ± 0,05	5,6 ± 0,0	22,7 ± 0,8	225,57		

*Datos expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3).

De acuerdo a los datos mostrados en el Cuadro XVIII, se identificó que el principal factor a considerar referente a la inestabilidad de los flujos es la turbidez, pues es el parámetro más variable de la materia prima, y está relacionado con el contenido de lípidos, los cuales por su naturaleza no polar generan una disminución en los flujos durante el proceso de microfiltración (Cancino *et al.*, 2004). Al observar los valores de turbidez inicial de la materia prima utilizada en cada ensayo, se evidenció que a mayor turbidez, menor son los flujos de permeado resultantes, cumpliendo con lo esperado. Dado lo anterior, se clasificó la materia prima utilizada como de baja (ensayo 1 y 2) o alta turbidez (ensayo 3 y 4). Este comportamiento se reafirma al observar los resultados mostrados en el Cuadro XIX, donde este comportamiento se cumple para distintos valores de FRV evaluados (Vaillant *et al.*, 2008).

Cuadro XIX. Valores de flujo de permeado de agua de pipa microfiltrada a distintos valores de FRV al utilizar materia prima con alta y baja turbidez.

Tipo de muestra	*Jp (L/m ² h)		
	FRV=15	FRV=25	FRV=35
Baja turbidez	385 ± 1 ^a	357 ± 25 ^a	327 ± 45 ^a
Alta turbidez	241 ± 41 ^b	208 ± 51 ^b	141 ± 1 ^b

*Datos expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=2). Letras distintas entre columnas indican diferencia significativa (p < 0,05).

Se determinó que en los primeros dos ensayos (1 y 2) se presentaron valores de flujo mayores que en los ensayos 3 y 4 (p < 0,05). Los resultados asociados a esta prueba se muestran en la **Figura 27** y **Figura 28**.

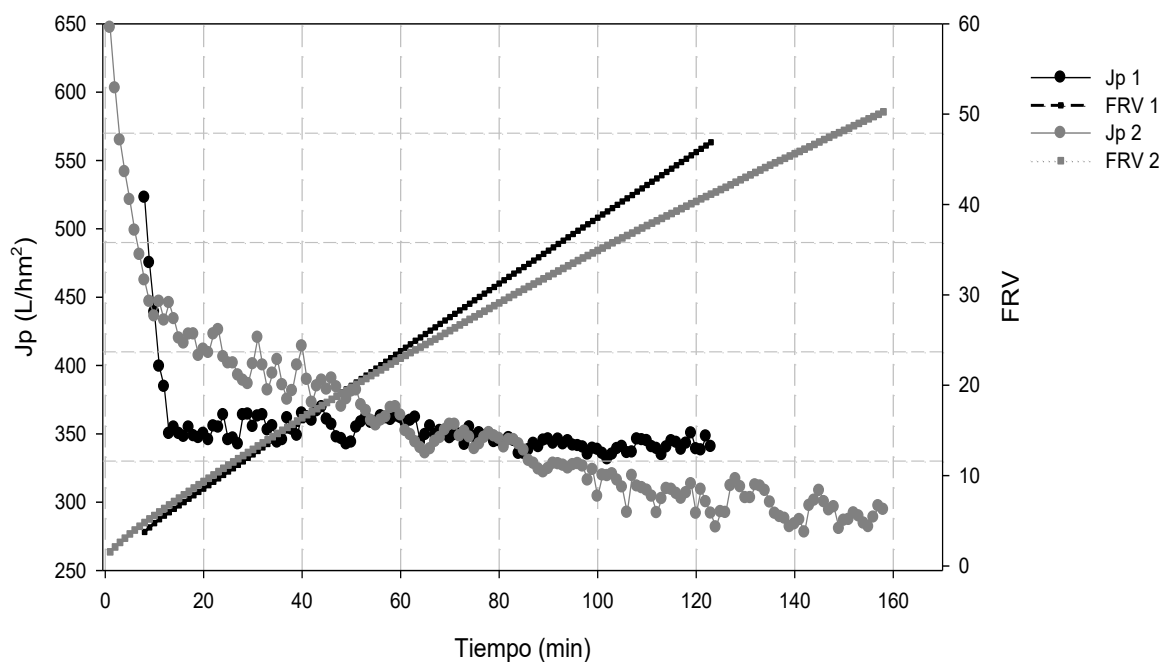


Figura 27. Evaluación 1 de flujo de permeado (Jp) y FRV respecto al tiempo de proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa (T= L ± 1 °C; P= P bar; T_{i1}=8,8 NTU; T_{i2}= 7,0 NTU).

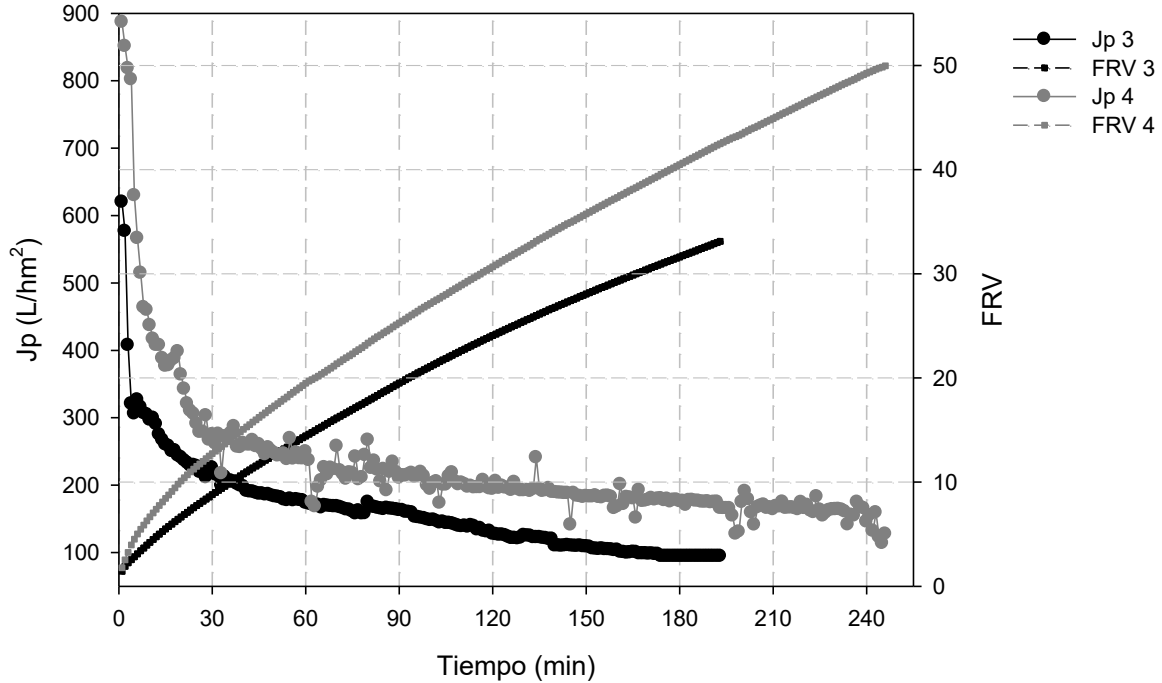


Figura 28. Evaluación 2 de flujo de permeado (J_p) y FRV respecto al tiempo de proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa ($T = L \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; $P = P \text{ bar}$; $T_{i3} = 48 \text{ NTU}$; $T_{i4} = 22,7 \text{ NTU}$).

Debido a la disminución en los flujos observada en los ensayos 3 y 4, se considera que se debe contemplar la madurez de la materia prima para el proceso de microfiltración. Además se deben de tomar en cuenta los menores flujos para el diseño del equipo a escala industrial. Dado lo anterior, se calcula el FRV óptimo y el rendimiento para los dos tipos de flujos obtenidos, mostrando dichos valores en el Cuadro XVIII. Para la estimación del equipo a escala industrial es importante considerar el flujo de producción diaria, además de las horas de proceso y el tamaño (área) del equipo a diseñar.

Se observa en todos los ensayos una rápida disminución del flujo de permeado durante los primeros minutos de proceso, seguido de una reducción más leve y por último se presenta una fase en la que los flujos se estabilizan. Los valores de FRV en todos los casos son crecientes respecto al tiempo. Las razones de estos comportamientos fueron explicadas en la sección 5.1.1.3.

Los flujos de permeado promedio son mayores durante los ensayos 1 y 2 que durante los ensayos 3 y 4. La diferencia de flujo de permeado promedio entre los primeros ensayos es de 135 L/hm² con respecto al promedio de los ensayos 3 y 4. Al observar los valores de J_p promedio de todas las pruebas, se evidencia que son mayores que los obtenidos en otros estudios con distintas materias primas, por lo que se considera que aún al contar con valores de turbidez altos, los flujos de permeado permitirían un proceso industrial promisorio (INAP, 2003; Montero, 2008; Vaillant, *et al.*, 2008). Además, se logró obtener datos de rendimiento de proceso de 95% o más, por lo que los desechos que se generan son bajos, y por ende se considera que este proceso sería rentable en este aspecto.

5.2.5 Evaluación del proceso de microfiltración tangencial de agua de pipa durante ensayos de larga duración

En la **Figura 29** se muestra el comportamiento del flujo de permeado y el FRV para ensayos de larga duración la MFT de agua de pipa. El ensayo consiste en dos etapas, la primera que se realiza a modo concentración y la segunda, en la que se extrae retenido con el fin de mantener los flujos de permeado y el FRV estables. Lo anterior se realiza con el fin de simular condiciones industriales, para mantener flujos altos durante el tiempo (Montero, 2008; Quesada, 2013).

Se puede observar que se obtuvieron flujos de permeado menores a los resultantes de las pruebas anteriores ($p=0,02$), ya que estos ensayos se realizaron a una velocidad tangencial inferior respecto a los ensayos de MFT previos, debido a daños en la bomba centrífuga del equipo, utilizada en los ensayos correspondientes a las secciones 5.1.1 y 5.2.4. Para los ensayos anteriores, la bomba centrífuga permitió procesar el agua de pipa con una velocidad tangencial de $K \text{ m s}^{-1}$, mientras que para los ensayos de larga duración, la nueva bomba generó una velocidad tangencial de $M \text{ m s}^{-1}$ (siendo K aproximadamente el doble de M). Al comparar los flujos de permeado a un FRV de 15, procesando a distintas velocidades tangenciales, se confirmó este comportamiento (ver Cuadro XX).

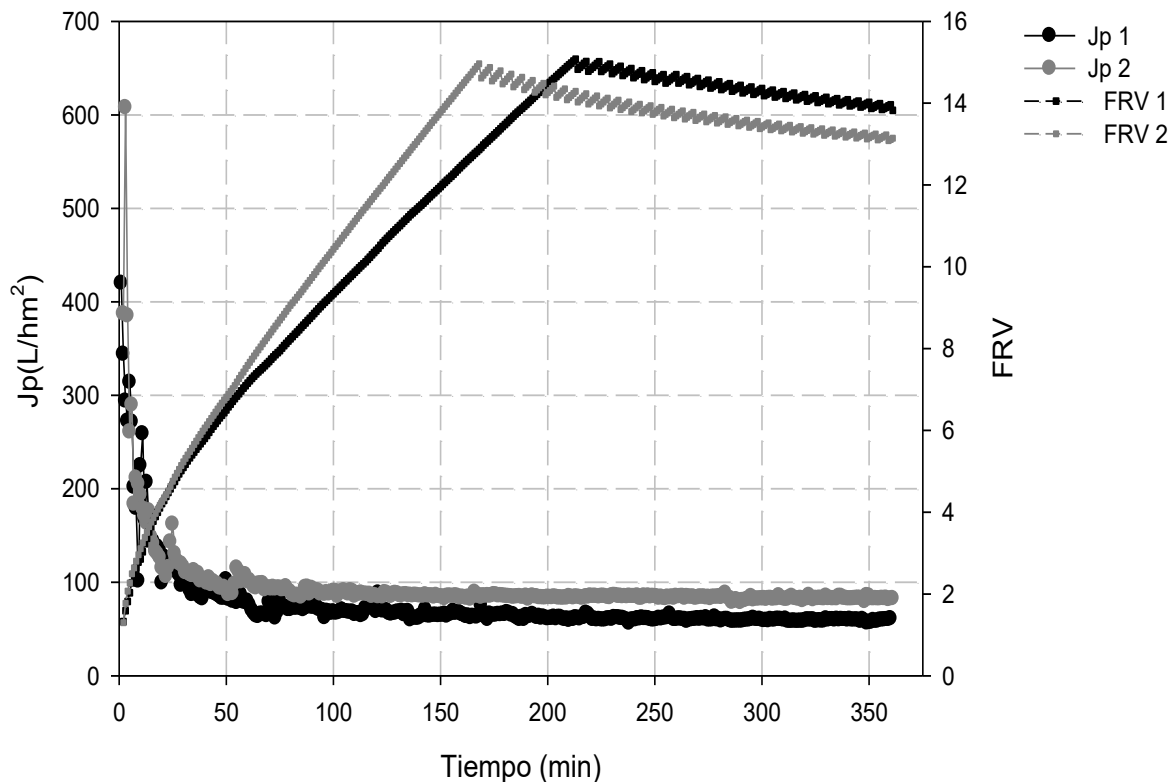


Figura 29. Comportamiento del flujo de permeado y del FRV con respecto al tiempo durante la MFT en modo alimentación-extracción ($T = L \pm 2^\circ\text{C}$; $P = P \pm 0,1 \text{ bar}$; $T_{i1} = 22,9 \text{ NTU}$; $T_{i2} = 23,4 \text{ NTU}$).

La velocidad tangencial es un parámetro esencial que afecta los flujos, pues ayuda a disminuir la colmatación en la superficie de la membrana. A pesar de los cambios en el sistema de bombeo del microfiltrador, se consideró analizar el comportamiento de la estabilidad tanto de los flujos como del FRV, pues al diseñar el equipo a nivel industrial, se utilizarán también otras bombas y se generará otra velocidad tangencial. En el Cuadro XX se muestra una comparación de los flujos de permeado y rendimientos obtenidos al variar la velocidad tangencial (Montero, 2008; Ortiz *et al.*, 2008; Soto, 2010).

Cuadro XX. Evaluación del efecto de la velocidad tangencial sobre el flujo de permeado y rendimiento de la operación de MFT de agua de pipa.

Prueba	Turbidez inicial (NTU)*	Velocidad tangencial (m/s)	**Flujo de permeado a FRV= 15 (L/h·m ²)	FRV	Rendimiento (%)
U ₁ -1	48 ± 2	K ± 0,2	241 ± 41 ^a	15	93
U ₁ -2	22,7 ± 0,8				
U ₂ -1	22,9 ± 0,1	M ± 0,1	72 ± 26 ^b	15	93
U ₂ -2	23,4 ± 0,1				

*Datos expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95%(n=3). **Datos expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95%(n=2). U=velocidad tangencial. K > M. Letras distintas como superíndice indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que con velocidades tangenciales distintas, se logró alcanzar rendimientos correspondientes a un FRV de 15. Sin embargo, como ya se indicó, y como se observa en los datos del Cuadro XX, los flujos de permeado, al variar la velocidad tangencial, disminuyen en promedio en 243, 8 L/h·m², lo cual industrialmente afectaría los tiempos de proceso.

Durante los procesos de MFT se debe buscar un balance entre los valores de flujo de permeado y el FRV de proceso, buscando el mayor rendimiento y disminuyendo los costos de producción asociados. La literatura recomienda procesar a flujos mayores de 50 L/h·m², y utilizar el FRV máximo posible, para aumentar el rendimiento (Quesada, 2013).

En este caso, se observa que los flujos obtenidos fueron mayores al límite establecido, y se decidió realizar la extracción de retenido al alcanzar un FRV de 15, a pesar de que se había establecido alcanzar un FRV de 20, de acuerdo con la turbidez inicial de la materia prima, como lo indica el Cuadro XVIII. Lo anterior debido a que se observó una disminución en los flujos y el FRV se incrementaba con menor velocidad que los ensayos previos (Ortiz *et al.*, 2008).

Las condiciones descritas permitieron obtener rendimientos altos, cercanos a 93%. De acuerdo con la literatura, este rendimiento es muy promisorio, pues con otras frutas, se han obtenido rendimientos menores. En ensayos con mango se reportan rendimientos en términos de jugo clarificado de 50%, con piña de 73%, maracuyá de 40%, mandarina de 50%, entre otros (Montero 2008; Quesada, 2013).

En otros estudios, se han utilizado valores de FRV menores cuando se efectúan ensayos de alimentación-extracción. Esto permite alcanzar flujos de permeado mayores, sin embargo, el rendimiento disminuye. En el caso de agua de pipa, se debe considerar qué aspecto es de mayor relevancia, si el rendimiento o el tiempo de proceso. Para analizar esta situación es importante contemplar el posible uso que se le pueda dar al retenido. En este caso, podría emplearse como fuente de sólidos insolubles, estabilizante en productos de coco o como fuente energética. Se debe valorar entonces si se desea aumentar los flujos de permeado, disminuyendo el rendimiento de la operación (Montero, 2008; Ortiz *et al.*, 2008; Soto, 2010; Debmandal & Mandal, 2011; Quesada, 2013).

Utilizar valores de FRV altos representan también una colmatación más rápida en la membrana, significando ciclos de lavado más recurrentes. En la práctica industrial, se desean procesos continuos y condiciones operacionales constantes a lo largo del tiempo, por lo que se recomienda realizar extracciones continuas de retenido, lo cual en este caso por las condiciones del equipo no se ejecutó (Quesada, 2013).

En la **Figura 29** se observa que para el ensayo 1 de larga duración, se tardó más tiempo en alcanzar el valor de FRV de 15 respecto al ensayo 2. Además durante el ensayo 1 los flujos de permeado obtenidos resultaron ligeramente menores, contando con un flujo promedio de 75,10 L/hm² en la primera prueba, mientras que en el ensayo 2 el flujo promedio fue de 94,81 L/hm². Se observó que para ambos ensayos de larga duración, la turbidez inicial de la materia prima resultó ser semejante. Para el primer ensayo la permeabilidad de la membrana rondaba 80%, mientras que para el segundo caso la permeabilidad fue de 97%, lo cual explica las diferencias en los flujos de permeado, pues la membrana se encontraba con menor colmatación para la segunda prueba (Chaverri, 2003; Montero, 2008).

Se observó también, que el valor del FRV no se logró mantener completamente constante cuando se realizan las extracciones de retenido. En otros estudios realizados en el equipo piloto del CITA se han observado comportamientos similares, que están relacionados con la extracción de retenido cada cierto tiempo. Durante el ensayo, al alcanzar el FRV de 15, se inició con la extracción de retenido cada 5 minutos, mientras que industrialmente se tendría una extracción continua (Quesada, 2013). Es importante analizar que los flujos de permeado se mantuvieron bastante constantes durante el ensayo, siendo un aspecto favorable para el futuro diseño del equipo y predicción de comportamientos industriales.

5.2.6 Evaluación de la preferencia sensorial

Según Hein *et al.* (2008) al realizar cambios en el procesamiento de un alimento es necesario evaluar la preferencia del consumidor, pues permite predecir si el nuevo producto será comprado de igual manera que el producto actual, o si eventualmente se podrían presentar cambios en las ventas por las modificaciones en el proceso. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro XXI.

Cuadro XXI. Resultados de prueba de preferencia realizada al comparar el agua de pipa microfiltrada con el agua de pipa actualmente procesada.

Número de jueces			Respuestas esperadas ($\alpha=0,05$)
No prefiere	MFT	Actual	
8	27	65	61

De acuerdo con los resultados, el consumidor posee preferencia por el producto actualmente procesado en la empresa. Cabe destacar que el proceso convencional de elaboración de agua de pipa envasada permite obtener una bebida distinta a la microfiltrada. El agua de pipa actualmente comercializada posee mayor turbidez (7,0 – 48, 0 NTU) respecto al agua de pipa MFT (menor a 5,0 NTU).

Los comentarios de los consumidores, indicaron que prefieren el producto actualmente comercializado por la empresa debido a que posee una apariencia más similar a la del agua de pipa proveniente directamente del coco, pues es un producto más turbio y cuenta con presencia de partículas dispersas, las que disminuyen notoriamente al aplicar la operación de microfiltración. Estas diferencias se pueden evidenciar en la **Figura 30**.

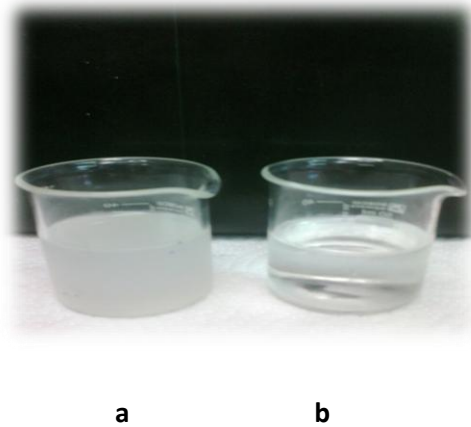


Figura 30. Muestras de agua de pipa (a) comercializada actualmente por la empresa (b) microfiltrada.

El producto microfiltrado presenta beneficios nutricionales respecto al producto actualmente comercializado, pues no posee preservantes químicos y se procesa a temperaturas relativamente bajas, que permiten la conservación de nutrientes como lo son las vitaminas. Considerando que una de las tendencias del mercado actual está relacionada con la búsqueda de alimentos naturales y saludables, se recomienda efectuar otro tipo de pruebas, como por ejemplo un estudio de mercado o sesiones de grupo, para definir el concepto del producto y contemplar opiniones de los consumidores. En otros países los consumidores se encuentran familiarizados con agua de pipa microfiltrada, sin embargo en Costa Rica aún no se conoce. Es importante, si se realiza el lanzamiento del producto al mercado, realizar una campaña publicitaria que permita informar al consumidor los beneficios nutricionales del producto (González, 2006; PROCOMER, 2012b).

Diferentes estudios indican, que en casos como éste, es importante comparar la preferencia del consumidor cuando contempla información extra del producto, como en este caso el beneficio de las propiedades nutricionales. Es decir, es posible que la preferencia por el agua de pipa microfiltrada aumente si el consumidor conociera las ventajas del producto.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La operación de desinfección de envases de PEAD aplicando un desinfectante cuyo agente activo es ácido peracético, resultó efectiva pues sensorialmente no se percibe un sabor residual en el agua de pipa.

Se encontró una presión transmembranaria (P bar) que permitió la obtención de altos flujos de permeado y no generó retención de sólidos solubles en el proceso de MFT para agua de pipa, al utilizar el equipo piloto del CITA.

La aplicación de una concentración de V ppm de ácido ascórbico en el agua de pipa permitió obtener un producto estable en cuanto al color hasta el día 42 de almacenamiento, sin transferir un sabor metálico residual.

Los flujos de permeado del agua de pipa al utilizar el equipo piloto del CITA presentaron gran variabilidad debido principalmente a variaciones en las características físico-químicas de la materia prima, siendo la turbidez un parámetro relacionado con dicho comportamiento.

Los flujos de permeado del agua de pipa al realizar ensayos en modo concentración, rondaron de 205,94 a 353,31 L/hm², considerándose valores aptos y recomendados para escalar el proceso a nivel industrial, obteniendo rendimientos altos en comparación con estudios con otras materias primas.

La aplicación de una etapa de envasado utilizando la cámara con luz UV no permitió alcanzar una vida útil adecuada para la comercialización del agua de pipa, presentando contaminación microbiana, debido al diseño de la cámara y materiales utilizados. El agua de pipa envasada a la salida del permeado, presentó características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas para la comercialización del producto.

La característica crítica para la vida útil del agua de pipa MFT resultó ser de carácter sensorial, relacionada con la aparición de sabores, olores y aspecto indeseable, causada probablemente por actividad enzimática residual del producto. El parámetro crítico sería la disminución del agrado por parte del consumidor, al día 28 de almacenamiento a 4 °C.

Los ensayos de larga duración permitieron demostrar que al alcanzar un FRV determinado y mantenerlo relativamente constante, los flujos de permeado del agua de pipa se logran mantener constantes y con valores promedio de 75,10 a 94, 81 L/hm², considerándose valores aceptables y siendo un aspecto favorable para el escalamiento del proceso y para el diseño del equipo a nivel industrial.

Al comparar el agua de pipa MFT respecto al agua de pipa comercializada actualmente por la empresa, el consumidor costarricense posee preferencia por el segundo producto, debido principalmente a las diferencias en la apariencia y presencia de partículas suspendidas en el producto actualmente comercializado, por lo que debe contemplarse este resultado para un futuro lanzamiento al mercado nacional.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda evaluar el uso de otras condiciones de desinfección de envases, pues a pesar de ser efectiva para el mantenimiento y conservación del producto, representa un tiempo elevado, que podría no ser viable a nivel industrial.

Se sugiere generar para el proceso industrial de MFT un sistema de envasado que por sus condiciones y materiales de construcción permita la limpieza no solamente con agentes químicos, sino también con vapor, para generar una mejor limpieza y desinfección del sistema, evitando la recontaminación del producto.

Es importante utilizar un empaque que sea una buena barrera al oxígeno, pues este acelera las reacciones enzimáticas de deterioro del producto. Además con el fin de conservar adecuadamente el ácido ascórbico se debe utilizar un empaque que proporcione protección ante la luz.

Se considera necesario iniciar controles más estrictos en las plantaciones de pipas, con el fin de realizar la cosecha en tiempos establecidos, permitiendo disminuir la variabilidad en las características físico-químicas de la materia prima a utilizar para el proceso de MFT. Es importante implementar un sistema de recolección del fruto que evite los golpes en la estructura del coco, ayudando a una mejor conservación del agua de pipa durante el transporte. Un dispositivo que

podría emplearse es el utilizado para la cosecha de pejibayes que comprende un saco con un relleno que amortigua el impacto.

Al implementar el proceso de MFT a escala industrial resultaría útil adoptar como medida de control de calidad del agua de pipa el parámetro de turbidez, tanto en la materia prima como en el producto final. La turbidez inicial permitiría predecir las magnitudes de flujos de permeado y tiempos de proceso, mientras que en el producto final representaría una medida de calidad para un jugo clarificado.

El establecimiento del proceso a escala industrial requiere de estrictas Buenas Prácticas de Manufactura y controles en la cadena de frío del producto, para permitir contar con un producto en buenas condiciones durante su tiempo de almacenamiento, transporte y distribución.

De acuerdo con los resultados, el agrado del consumidor por el producto disminuye en el día 28 de almacenamiento. Sin embargo, se recomienda contar con algunos días previos como respaldo para estimar la vida útil del producto, con el fin de no arriesgar la calidad del producto y prestigio de la compañía.

7 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AGUILERA, O., BARANDA, M., NÚÑEZ, R., RAMÍREZ, L. & ROMERO P. 2001. Estudio de prefactibilidad para una bebida hidratante de coco. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- ALVARO, J., MORENO, S., DIANEZ, F., SANTOS, M., CARRASCO, G. & URRESTARAZU, M. 2009. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. *Journal of Food Engineering*. 95(1):11-15.
- ANZUETO, C. 1991. Vida útil de alimentos procesados. Costa Rica. Coalición Costarricense de Iniciativas de Desarrollo, San José.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis 16a. Métodos 932.12 y 981.12. Association of Official Analytical Chemists. Maryland.
- BARBA, F., JAGER, H., MENESES, N., ESTEVE, M., FRÍGOLA, A. & KNORR, D. 2011. Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Nutrition and Food Chemistry, University of Valencia*. 14: 18-24.
- BARCÍA, J. 2007. Estudio de factibilidad para la comercialización de cocos (*Cocos nucifera* L.) tiernos en la Fortuna, Costa Rica. Tesis licenciatura. Universidad EARTH. Limón, Costa Rica.
- BARREIRO, J., MILANO, M. & SANDOVAL, A. 1997. Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. *Journal of Food Engineering*. 33 (3-4): 359-371.
- BRERA, C., DE SANTIS, B., DEBEGNACH, F., GREGORI, E. & PANNUNZI, E. 2012. Food Analysis by HPLC. 3 ed. CRC Press.
- BSAC. 2012. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. Inglaterra. 17p.
- CAMINITI, I., NOCI, F., MUÑOZ, A., WHYTE, P., MORGAN, D., CRONIN, D. & LYNNG, J. 2011. Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chemistry*, 124 (4): 1387-1392.

- CANCINO, B., RUBY, R. & ASTUDILLO, C. 2004. Clarificación de jugo de uva por microfiltración. Escuela de Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Waddington 716, Valparaíso, Chile. CREAS, Centro de Estudios de Alimentos Saludables.
- CARNEIRO, L., SANTOS, I. DOS., SANTOS, F. DOS., MARTINS, V. & CORRÊA, L. M. 2002. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination*. 148: 93-98.
- CASTRO, B. & XAVIER, A. 2009. Clarificación a escala banco de jugo de manzana por ultrafiltración. Departamento de Operaciones Unitarias en Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos. Universidad de la República, Uruguay.
- CHACÓN, A. 2006. Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana*. 17(2): 243-264.
- CHAVERRI, M. 2003. Elaboración de un jugo de melón clarificado por medio de microfiltración tangencial. Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- CISSE, M., VAILLANT, F., SORO, D., REYNES, M. & DORNIER, M. 2011. Crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Food Engineering* 106(1):20-27.
- CITA. 2008. Determinación de la actividad antioxidante, Método ORAC con Espectrofluorómetro Biotek, AQCITA-M037. Emisión N° 4. San José, Costa Rica.
- CITA .2010a. Determinación de coliformes totales. P-SA-MM-002. San José, Costa Rica.
- CITA .2010b. Determinación de coliformes fecales. P-SA-MM-003. San José, Costa Rica.
- CITA .2010c. Determinación de *E. coli*. P-SA-MM-004. San José, Costa Rica.
- CODEX ALIMENTARIUS. 2005. Norma General del Codex para Zumos (jugos) y Néctares de Frutas. CODEX STAN 247-2005. Roma.
- COLES, R., MCDOWELL, D. & KIRWAN, M. 2003. Food packaging technology. United States. CRC Press.

- COMEX, MEIC & MAG. 2009. Se decreta el Reglamento Técnico Centroamericano de Alimentos. La Gaceta, San José. Setiembre 22:2-12.
- CORRALES, M., DE SOUZA, P., STAHL, M. & FERNÁNDEZ, A. 2012. Effects of the decontamination of a fresh tiger nuts' milk beverage (horchata) with short wave ultraviolet treatments (UV-C) on quality attributes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 13:163-168.
- DAS PURKAYASTHA, M., MAHNOT, N., MAHANTA, C., MANDAL, M. & CHAUDHURI, M. 2012. Effect of L-ascorbic acid addition on the quality attributes of micro-filtered coconut water stored at 4°C. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 16:69-79.
- DEBMANDAL, M. & MANDAL, S. 2011. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4(3):241-247.
- DE LEÓN, S. & DE LORES, M. 2005. *Processing Fruits. Science and Technology*. 2 ed. United States. Copyright, CRC Press LLC.
- DESÊCHES, L. 2006. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies. Packing technologies of functional food*. CRC Press.
- FALGUERA, V., PAGÁN, J., GARZA, S., GARVÍN, A. & IBARZ, A. 2011. Ultraviolet processing of liquid food: A review. *Food Research International* 44(6):1580-1588.
- FAO. 1998. Nueva bebida para el deporte. Roma. INTERNET. <http://www.fao.org/ag/es>. Visitado el 18 setiembre del 2012.
- FAO. 2007. Agua de coco embotellada. Roma. INTERNET. <http://www.fao.org/ag/es>. Visitado el 18 setiembre del 2012.
- FENG, P., WEAGANT, S. & JINNEMAN, K. 1998. BAM: Aerobic Plate Count. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 4. FDA.
- FERNÁNDEZ, R., KYANKO, V. & POSE, G. 2008. Estudio de la efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporos fúngicos como una estrategia alternativa al control poscosecha de la pudrición causada por mohos en frutas y hortalizas. CONICET. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.

- FLANDERS CORPORATION. 2003. HEPA Filters. INTERNET. <http://www.flanders-csc.com/Downloads/hepa.pdf>. Visitado el 26 de julio del 2012.
- FLORES, L. 2012. Uso de nuevos empaques en la industria de agua de pipa. San José, Disaso S.A. Comunicación personal.
- FONSECA, A., MONTE, F., DE OLIVEIRA, M., DE MATTOS, M., CORDELL, G., BRAZ, R. & LEMOS, T. 2009. Coconut water (*Cocos nucifera* L.)—A new biocatalyst system for organic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57(1-4):78-82.
- GODOY, C. 2004. Conservación de dos variedades de arándano alto en condiciones de frío convencional. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Buenos Aires, Argentina.
- GONNET, J.F. 1998. Colour effects of copigmentation of anthocyanins revisited -1. A colourimetric definition using CIELAB scale. *Food Chemistry* 63: 409-441.
- GONZÁLEZ, R. 2005. Caracterización de la cadena agroalimentaria y agroindustrial del cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Colima. Consejo Estatal del Coco de Colima, A. C. México.
- GONZÁLEZ, R. 2006. Estudio de la Demanda Nacional de Pulpa, Fibra y Agua para la Compactación de la Oferta Regional del Cocotero. México, CONACOCO.
- HAMMER. 2012. Aceite de coco: una maravilla de la naturaleza. INTERNET. <http://e-rastrillo.blogspot.com/2012/08/aceite-de-coco-una-maravilla-de-la.html>. Visitado el 16 de febrero del 2013.
- HEIN, K., JAEGER, S., CARR, T. & DELAHUNTY, C. 2008. Comparison of five common acceptance and preference methods. *Food Quality and Preference* 19(7):651-661.
- HERNÁNDEZ, A. 2003. Microbiología industrial. EUNED. Costa Rica.
- HERNÁNDEZ, A. 2006. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. Memoria de Doctorado en Biología. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
- HERNÁNDEZ, C. 2009. Acción y efecto de la polifenoloxidasas en alimentos. Tesis licenciatura. Universidad Veracruzana, Química Industrial. Veracruz, México.

- HOUGH, G. & FISZAMAN, S. 2005. Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. España, CYTED.
- HUNTER LAB. 2003. CIE L* a* y b* Color Scale. INTERNET. http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf. Visitado el 4 de julio del 2012.
- IICA. 2001. Boletín del Mercado del coco. Nueva San Salvador, El Salvador, C.A.
- IGUTTII, A., PEREIRA, A., FABIANO, L., SILVA, R. & RIBEIRO, E. 2011. Substitution of ingredients by green coconut (*Cocos nucifera* L.) pulp in ice cream formulation. *Procedia Food Science* 1:1610-1617.
- INIAP. 2003. Aplicación de nuevas tecnologías agroindustriales para el tratamiento de frutas tropicales y andinas para exportación. Ecuador. INTERNET. http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Aplicaci%C3%B3n_nuevas_tecnolog%C3%ADas_agroindustriales_tratamiento_frutas_tropicales_andinas_exportaci%C3%B3n.pdf. Visitado el 19 de enero del 2014.
- JAIRUS, D., GRAVES, R. & SZEMPLENSKI, T. 2012. Handbook of Aseptic Processing and Packaging. 2 ed. CRC Press.
- KYANKO, M., RUSSO, M., FERNÁNDEZ, M. & POSE, G. 2010. Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición poscosecha de frutas y hortalizas. *Información tecnológica*. 21(4):125-130.
- KOUTCHMA, T., FORNEY, L. & MORARU C. 2009. Ultraviolet Light in Food Technology Principles and Applications. CRC Press, Florida. Cap. 1. p.1-31.
- KROCHTA, J. 2007. Handbook of Food Engineering. Second edition. Taylor and Francis Group. Cap. 13. p. 69-81.
- KUNIGK, L. & ALMEIDA, M. 2001. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:38-41.

- LAORKO, A., TONGCHITPAKDEE, S. & YOURAVONGA, W. 2013. Storage quality of pineapple juice non-thermally pasteurized and clarified by microfiltration. *Journal of Food Engineering*. 116: 554-561.
- LEÓN, G. & ROSERO, E. 2009. Obtención de jugo clarificado de uvilla (*Physalis peruviana*. L.) utilizando degradación enzimática y microfiltración tangencial. Tesis Ingeniería Agroindustrial. Universidad Técnica del Norte. Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra.
- LIM, S. & BLATCHLEY, R. 2009. UV disinfection system for cabin air. *Advances in Space Research*. 44(8): 942-948.
- LIZCANO, L., LÓPEZ, C. & ROLDÁN, C. 2009. Manual de aplicación de sistemas APPCC en industrias lácteas. CECAM, Castilla, La Mancha.
- LIU M. & FLOROS, J. 2012. *Thermal Food Processing. New Technologies and Quality Issues*. 2 ed. CRC Press, Florida. Cap.17 p. 441–458.
- MAG. 2001. Programa nacional de frutas de El Salvador: Boletín de mercado del coco. El Salvador, Nueva San Salvador.
- MARIS, S., NORMA, S., BIBIANA, A. & LEÓN, S. 2004. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de capacitación. FAO, Roma.
- MATSUI, K., GRANADO, L., DE OLIVEIRA, P. & TADINI, C. 2007. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *Food Science and Technology*. 40(5):852-859.
- MATSUI, K., GUT, J., DE OLIVEIRA, P. & TADINI, C. 2008. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *Journal of Food Engineering*. 88(2):169-176.
- MATURIN, M. & PEELER, J. 2001. BAM: Aerobic Plate Count. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 3. FDA.
- MÉNDEZ, L. 2001. El agua de coco trasciende fronteras. *El diario de hoy*, El Salvador: Marzo lunes 19: s.p.

- MÉNDEZ, A. & MORENO, E. 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Ciencia* (1): 233-245.
- MILLER, J. 2002. Enciclopedia of Pest Management. Canadá, CRC Press.
- MOLER, J. 2004. Aplicación de microfiltración tangencial en la obtención de jugos de frutas tropicales. Reporte de pasantía. CITA, Costa Rica.
- MONTERO, M. 2008. Estudio del proceso para la elaboración de jugo clarificado de mora por microfiltración tangencial. Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- MUÑOZ, H. 2010. Gestión medioambiental de salmueras de desalado de bacalao. Tratamiento mediante tecnologías de membranas. Tesis doctorado. Universidad Politécnica de Valencia.
- MUTHUKUMARAPPAN, K. & MARELLA, C. 2010. Mathematical Modeling of Food Processing. CRC Press.
- NEAL, J., MARQUEZ, M., CABRERA, E., LUCIA, L., O'BRYAN, C., CRANDALL, P., RICKE, S. & CASTILLO, A. 2011. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Food Research International*. 45:1123-1128.
- OROZCO, C., ALBARRÁN, G., ESTEBAN, R. & GARCÍA, S. 2008. Ultrafiltración de caldos de fermentación. *Información tecnológica*. 9 (1): 37-44.
- ORTIZ, M., VÉLEZ, C. & MEJÍA, E. 2008. Modelos matemáticos de la colmatación de membranas en microfiltración tangencial. *Ingeniería e investigación*. 28(1): 123-132.
- OVALLES, J., LEÓN, A. & VIELBA, R. 2002. Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 44:70-77.
- PALA, Ç. & TOKLUCU, A. 2011. Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(6):790-795.
- PASCUAL, M. & CALDERÓN, V. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2 ed. Díaz de Santos. Madrid, España.

- PRADES, A., DORNIER, M., DIOP, N. & PAIN, J. 2012. Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits* 67(2):87-107.
- PROCOMER. 2014a. Costa Rica. Estadísticas de exportación. Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica. San José INTERNET. [http:// www.procomer.com](http://www.procomer.com). Visitado el 19 de enero del 2014.
- PROCOMER. 2012b. Se duplica la venta de agua de coco en la Unión Europea. INTERNET. <http://www.procomer.com/contenido/articulos/se-duplica-la-venta-de-agua-de-coco-en-la-uni%C3%B3n-europea.html>. Visitado el 19 de febrero del 2013.
- PUNCHIHEWA, P. & ARANCON, R. 1999. Coconut: Post-harvest operations. Indonesia. Asian and Pacific Coconut Community.
- QUESADA, C. 2013. Determinación de las condiciones óptimas del tratamiento enzimático acoplado a un proceso de microfiltración tangencial a ser aplicado en una empresa procesadora de frutas y vegetales para la obtención de jugo clarificado de piña (*Ananas comosus*). Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- RAI, P. & SIRSHENDU, D.E. 2011. Membrane Technologies and Applications. Chapter 13. Membrane-Based Separation Process for Juice Processing. CRC Press.
- REDDY, K., DAS, M. & DAS, S. 2005. Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water. *Journal of Food Engineering* 69(3):381-385.
- RODRÍGUEZ, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D.F., México.
- ROESSLER, E., PANGBORN, R., SIDEL, J. & STONE, H. 1978. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle test. *Journal of Food Science*. 43:940-947.
- ROLLE, R. 2007. Buenas prácticas para la producción en pequeña escala de agua de coco embotellada. Roma, FAO.
- ROMERO, J. 2010. Control Avanzado en Procesos Industriales de Microfiltración y Ultrafiltración tangencial. Tesis Maestría. Universidad Politécnica de Valencia. España.

- SALAS, R. 2003. Estudio del proceso de clarificación de jugo de banano mediante microfiltración tangencial. Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- SANDOVAL, W. 2009. Envasado de alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Centro de Investigación y Capacitación de envases y embalajes. Lima, Perú.
- SEBRANEK, J. & HOUSER, T. 2006. Modified Atmosphere Packaging. In Leo, M., Nollet, L., & Toldrá, F. Eds. Advanced technologies for meat processing. CRC, Florida.
- SOTO, M. 2010. Evaluación del efecto de tratamientos físicos acoplados a un tratamiento enzimático sobre las propiedades físico-químicas y el contenido de compuestos antioxidantes de jugo de mora. Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- SOTO, M., ALPIZAR, R., CALDERÓN, S. & PÉREZ, A. 2012. Estudio preliminar del efecto de la microfiltración tangencial y pasteurización sobre las propiedades físico-químicas (pH, sólidos solubles y turbidez), características sensoriales y estabilidad microbiológica de agua de pipa durante almacenamiento en refrigeración. CITA, San José, Costa Rica.
- SOTTO, A. 2008. Aplicación de la tecnología de membranas de nanofiltración y ósmosis inversa para el tratamiento de disoluciones acuosas de compuestos fenólicos y ácidos carboxílicos. Tesis doctorado. Universidad Rey Juan Carlos. Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología. Madrid.
- TELEZ, C., FISCHER, G. & QUINTERO, O. 1999. Comportamiento fisiológico y físico-químico en la poscosecha de curuba de castilla, *Passiflora mollissima* Bailey, conservada en refrigeración y temperatura ambiente. Universidad Nacional de Colombia. 6 (3):13-18.
- TOURNAS, V., STACK, M., MISLIVEC, P., KOCH, H. & BANDLER, R. 2001. BAM: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 18. FDA.
- TOURNAS, V., RIVERA, J. & MEMON, S. 2011. Comparison of the SimPlate yeast and mould color indicator to the BAM method for quantification of fungi in naturally-contaminated foods. Food Control. 22 (5): 775-777.

- TSO, C. 2010. Predicción de la vida útil de jugo no concentrado de piña *Ananas comosus*, pasteurizado y envasado en empaque aséptico. Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- UNIVERSIDAD DE CHAPINGO. 2002. Estudio para dar valor agregado al cultivo del cocotero (*Cocos nucifera* L.). Chapingo, México.
- UYSAL, C. & KIRCA, A. 2011. Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(6): 790-795.
- VAILLANT, F., PÉREZ, A. & VÍQUEZ, F. 2004. Microfiltración tangencial: una alternativa innovadora para la transformación de frutas tropicales. *La Alimentación Latinoamericana*. 252: 38-46.
- VAILLANT, F., PÉREZ, A., ACOSTA, O. & DORNIER, M. 2008. Turbidity of pulpy fruit juice: A key factor for predicting cross-flow microfiltration. *Journal of Membrane Science*. 325 (1): 404-412.
- VALENZUELA, A. & MELÉNDEZ, D. 2004. Caracterización agronómica y química de diferentes variedades de coco (*Cocos nucifera* L.) para la elaboración de bebidas hidratantes. Tesis licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica.
- VALVERDE, P. 2011. Evaluación del efecto de la operación de microfiltración tangencial sobre la concentración de taninos del ácido elálgico, antocianinas y capacidad antioxidante en el jugo de mora (*Rubus adenotrichus*). Tesis licenciatura. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- VENUGOPAL, V. 2005. *Seafood Processing. Adding Value Through Quick Freezing, Retortable Packaging and Cook-Chilling*. CRC Press, Florida. Cap. 6. p. 167-195.
- WALSTRA, V. 2005. *Dairy Science Technology*. 2 ed. CRC Press. Florida.
- WANG, L. 2008. *Energy Efficiency and Management in Food Processing Facilities*. Chapter 17. Membrane Processing of Foods. CRC Press.
- WISNIEWSKY, M., GLATZ, B., GLEASON, M. & REIMEIER, C. 2000. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers. *Journal of Food Protection*. 63: 703–708.

ZACCARI, F., CROSSA, M. & IRISITY, M. 2004. Evolución de la calidad de frutos de butiá (*Butia capitata*, Mart. Beec.) en almacenamiento refrigerado. Grupo Poscosecha de Frutas y Hortalizas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

ZAMORA & GODNER 1998 Operaciones post-cosecha de coco. Asian and Pacific coconut community. Boletín informativo. México.

8 ANEXOS

8.1 Resultados de prueba sensorial de diferencia para desinfección de envases

Cuadro XXI. Muestras presentadas a cada panelista en la prueba triangular realizada para muestras de agua de pipa envasadas en botellas con y sin desinfectar.

Panelista	Muestras				Muestra seleccionada	Resultado
	A	A	B	B		
1	517		912	245	912	I
2	762		501	954	501	I
3	792		900	621	900	I
4	587	753		161	161	C
5	879	153		400	400	C
6	568	902		225	902	I
7	486		181	764	181	I
8	857	720		458	720	I
9	816		761	984	816	I
10	287	615		132	132	C
11	626		948	272	272	I
12	573	469		851	851	C
13	320		581	252	320	C
14	891		920	723	723	I
15	302	924		759	924	I
16	364	845		463	924	I
17	158	471		847	158	I
18	157	622		396	396	C
19	822		789	551	551	I
20	604		908	431	431	I

Donde: A= agua de pipa envasada en botella sin desinfectar.

B= agua de pipa envasada en botella desinfectada.

I= incorrecto

C= correcto

8.2 Análisis de varianza para el estudio de almacenamiento definitivo

Cuadro XXII. Análisis de varianza para la evaluación del pH de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P > F
Modelo	5	0,6061	0,121	18,3236	<0,0001*
Error	120	0,7938	0,0066		
C. Total	125	1,3999			

*significativo, g.l.: grados de libertad ,n=3.

Cuadro XXIII. Parámetros estimados para la evaluación del pH de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	F	P > F
Tiempo	1	0,017	2,61	0,1088
Tipo de envasado	1	0,015	2,25	0,1361
Lote	2	0,520	0,52	<0,0001*

*significativo, g.l.: grados de libertad ,n=3.

Cuadro XXIV. Análisis de varianza para la evaluación de los sólidos solubles (°Brix) de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P > F
Modelo	5	6,714	1,3428	31,9856	<0,0001*
Error	120	5,0378	0,04198		
C. Total	125	11,7518			

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3.

Cuadro XXV. Parámetros estimados para la evaluación de sólidos solubles (°Brix) de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	F	P > F
Tiempo	1	0,463	11,03	0,0012*
Tipo de envasado	1	1,049	25,00	<0,0001*
Lote	2	5,176	61,65	<0,0001*

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3.

Cuadro XXVI. Análisis de varianza para la evaluación de la turbidez de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P > F
Modelo	5	13071,88	2614,38	113,48	<0,0001*
Error	120	2764,47	23,04		
C. Total	125	15836,35			

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3, R²=0,82.

Cuadro XXVII. Parámetros estimados para la evaluación de la turbidez de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	F	P > F
Tiempo	1	4765,65	206,66	<0,0001*
Tipo de envasado	1	4166,55	180,66	<0,0001*
Lote	2	39,12	0,8491	0,4303
Tipo de envasado* tiempo	1	4100,54	177,99	<0,0001*

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3,

Cuadro XXVIII. Análisis de varianza para la evaluación del recuento de mohos y levaduras de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P > F
Modelo	5	509,2283	101,846	214,9934	<0,0001*
Error	120	56,8458	0,474		
C. Total	125	56,8458			

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3, R²=0,88.

Cuadro XXIX. Parámetros estimados para la evaluación del recuento de mohos y levaduras de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	F	P > F
Tiempo	1	161,02	339,90	<0,0001*
Tipo de envasado	1	237,62	501,61	<0,0001*
Lote	2	0,61	0,65	0,523
Tipo de envasado* tiempo	1	109,97	232,14	<0,0001*

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3, R²=0,88.

Cuadro XXX. Análisis de varianza para la evaluación del recuento total aerobio de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P > F
Modelo	5	576,644	115,329	164,9383	<0,0001*
Error	120	83,907	0,699		
C. Total	125	660,5517			

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3, R²=0,82.

Cuadro XXXI. Parámetros estimados para la evaluación del recuento total aerobio de agua de pipa MFT+CUV y MFT almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	F	P > F
Tiempo	1	140,28	200,62	<0,0001*
Tipo de envasado	1	307,69	440,05	<0,0001*
Lote	2	4,02	2,87	0,060
Tipo de envasado* tiempo	1	124,64	178,26	<0,0001*

*significativo, g.l.: grados de libertad, n=3, R²=0,82.

8.3 Análisis de varianza para evaluación sensorial de agua de pipa.

Cuadro XXXII. Análisis de variancia para evaluación de intensidad de sabor agrio para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	P>F
Modelo	6	239,38	39,89	7,225	0,0001*
Error	147	811,75	5,52		
C. Total	153	1051,13			

*significativo, n=24, g.l.: grados de libertad

Cuadro XXXIII. Evaluación de intensidad de turbidez para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	P>F
Modelo	6	130,53	21,75	16,35	0,0001*
Error	147	194,31	1,33		
C. Total	153	324,84			

*significativo, n=24, g.l.: grados de libertad

Cuadro XXXIV. Evaluación de agrado general para muestras de agua de pipa microfiltrada almacenada a 4 °C durante el tiempo.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	P>F
Modelo	6	1262,7	210,45	43,46	0,0001*
Error	658	3186,4	4,84		
C. Total	664	4449,13			

*significativo, n=95, g.l.: grados de libertad

8.4 Procedimiento de limpieza de equipo piloto de MFT

Cuadro XXXV. Procedimiento de limpieza del equipo piloto de MFT (CITA, 2013).

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
-	-	-	-	Terminado el proceso de MF, cierre la válvula de permeado, abra la válvula de retenido y espere a que no salga más fluido. Cierre la válvula de retenido	Recoja el retenido en un recipiente
Agua	10	40	60	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	60	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto. ** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Disolución básica(Hipoclorito de sodio NaOCl 500 ppm; Hidróxido de sodio NaOH 1% m/m)	20	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Utilice alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 182,0 g de NaOH y 76 mL de cloro 12% en 18 L*

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Utilice alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 364,0 g de NaOH en 18 L*
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	60	Abra lentamente la válvula de permeado y cierre la válvula del reciclo, recircule por el tiempo establecido.	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	10	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	ambiente	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-

* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el

líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.

**** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.**

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
Disolución ácida (Ácido nítrico HNO ₃ 1% m/m)	15	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Utilice alrededor de 18 L de agua (un balde grande lleno) Utilice 261,0 g de HNO ₃ 70% en 18 L*
Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
Disolución ácida (Ácido nítrico HNO ₃ 1% m/m)	15	40	60	Abra lentamente la válvula de permeado y cierre la válvula del reciclo, recircule por 15 min	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	10	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	ambiente	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**

-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
---	---	---	---	--	---

* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.

** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
Agua	-	Presión de proceso	25	Realice la medición de la permeabilidad de la membrana. Si está en un 20% por debajo de la permeabilidad original del equipo realice nuevamente el procedimiento de limpieza ya descrito	Utilice agua suavizada
Disolución desinfectante (Hipoclorito de sodio NaOCl 200 ppm)	10	40	ambiente	Llene el sistema, coloque la manguera del reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Utilice alrededor de 18 L de agua (un balde grande lleno) Utilice 30 mL de cloro 12% en 18 L