

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Manzana

Se usó manzana Golden Delicious (*Malus Sylvestris*) adquirida en un mercado local.

6.1.2 Jarabe

El jarabe se prepara disolviendo en agua destilada azúcar blanca refinada, sulfato de zinc hepta-hidratado ($Zn\ SO_4 \cdot 7H_2O$) grado analítico marca Química Meyer , cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot H_2O$) grado analítico marca Omnicem y sorbato de potasio marca Fluka chemika.

6.1.3 Equipo de impregnación

Se emplean pequeños desecadores de vidrio con tapa hermética que tienen una válvula para poder ejercer el vacío, mallas de plástico adaptadas al diámetro del desecador, pesas de 200 g, un vacuómetro y una bomba de vacío Cenco – Hyvac para laboratorio de Central Scientific Co como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Equipo de impregnación

6.1.4 Análisis microbiológico

Se usa agar nutritivo (Merck, México) para determinar mesófilos, agar papa – dextrosa (PDA) acidificado para determinar mohos y levaduras, agua peptonada al 0.1% (Merck, México); todos esterilizados a 121°C por 15 min.

6.2 Metodología

6.2.1 Determinación de porosidad

Para obtener la porosidad de la manzana se emplea el método descrito por Fito y Pastor (1994) usando el equipo que se muestra en la figura 2. Se cortan placas de manzana de aproximadamente 3.5 x 2.5 x 1.2 cm por lado sin que estas placas contengan restos de centro de la fruta o cáscara, se determina su volumen y peso inicial. Las placas se colocan en el desecador donde se sumergen en una solución

isotónica de sacarosa en una relación 1:10 (peso/peso), aplicando cinco diferentes presiones de vacío (12, 26, 30, 45 y 50 cm Hg) por 10 min, posteriormente se rompe el vacío y se deja el sistema a presión atmosférica por 25 min, al finalizar este tiempo (tiempo de relajación) se elimina el exceso de jarabe poniendo la manzana impregnada sobre una superficie limpia, deslizándola a lo largo de 30 cm de un lado a otro y secando la superficie de deslizamiento con papel absorbente. Finalmente se registra el peso de las muestras.

La porosidad efectiva se determina con la regresión lineal de X (ecuación 6.1) contra $(1 - 1/r)$, donde la pendiente es ε_e (Gilibert, 2002).

$$X = \frac{(M_f - M_i)}{\rho \bullet V_i} \quad (6.1)$$

$$X = \varepsilon_e \left(1 - \frac{1}{r} \right) \quad (6.2)$$

Donde

X = fracción volumétrica de la fruta impregnada

M_f = masa final de la fruta (g)

M_i = masa inicial de la fruta (g)

ρ = densidad de la solución isotónica a impregnar (g/cm³)

V_i = volumen inicial de la fruta (cm³)

ε_e = porosidad efectiva de la fruta (%)

r = relación de compresión aparente ($r = P_{atm}/P_{trab}$)

P_{atm} = 59.05 cm de Hg en Cholula, Pue

6.2.2 Técnica de impregnación / deshidratación osmótica

La manzana se corta en placas de 3.5 x 2.5 x 1.2 cm. Se pesan 9 placas (aprox. 90 – 95 g en total), se colocan en el desecador de vidrio donde se agrega el jarabe en una relación de 1:3 (peso/peso). Las placas se sumergen en los jarabes de diferentes concentraciones de sacarosa (13 y 50 %), donde se disolvieron previamente 1000 ppm de cloruro de calcio, 375 ppm de sulfato de zinc y una cierta cantidad de sorbato de potasio (500 y 1000 ppm), posteriormente se aplica una presión de vacío de 50 cm de Hg por 10 min, con un tiempo de relajación de 24 y 45 min. Al final del tratamiento se retira la fruta del jarabe usando una coladera, en la cual se deja escurrir la manzana por 3 min transcurrido este tiempo se elimina el exceso de jarabe deslizando la fruta a lo largo de 30 cm de una superficie limpia y seca, por los dos lados principales de las placas de manzana varias veces y limpiando cada vez el jarabe de la superficie con papel absorbente, se procede a pesar nuevamente la manzana y se anota el valor como peso final.

Con los datos de peso inicial y final, °Brix, y contenido de humedad obtenidos se calcula la ganancia de sólidos (SG), pérdida de agua (WL) y pérdida de peso (WR) (Levi et al., 1983) de acuerdo a las ecuaciones:

$$SG = \frac{(M_{pf})(TS_{pf}) - (M_{pi})(TS_{pi})}{(M_{pi})} \times 100 \quad (6.3)$$

$$WL = \frac{(M_{pi})(1 - TS_{pi}) - (M_{pf})(1 - TS_{pf})}{(M_{pi})} \times 100 \quad (6.4)$$

$$WR = \frac{(M_{pi}) - (M_{pf})}{(M_{pi})} \times 100 \quad (6.5)$$

Donde

M_{pi} = peso inicial de la muestra (g)

M_{pf} = peso final de la muestra (g)

TS_{pi} = sólidos solubles iniciales de la muestra (°Brix)

TS_{pf} = sólidos solubles finales de la muestra (°Brix)

6.2.3 Métodos analíticos

Los análisis efectuados en la manzana fresca y la manzana impregnada se realizaron por triplicado.

6.2.3.1 Medición del cambio de volumen

Para determinar el volumen se mide el ancho, largo y espesor de tres placas de manzana usando un vernier de acero inoxidable antes y después de la impregnación.

Con la siguiente fórmula se calcula el cambio de volumen:

$$CV = \frac{V_i - V_f}{V_i} \times 100 \quad (6.6)$$

V_i = volumen inicial (cm^3)

V_f = volumen final (cm^3)

6.2.3.2 Actividad de agua (a_w)

La a_w de la fruta y del jarabe es determinada usando el higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1 calibrado y operado como lo describe López – Malo et al. (1993).

6.2.3.3 Sólidos solubles

Los °Brix de la fruta y del jarabe se determinan usando el refractómetro digital ATAGO, modelo IR – 1 a 25 °C.

6.2.3.4 pH

El pH se determina usando el potenciómetro Orion modelo 420 (Orion Research, Inc., Boston MA.) por inmersión del electrodo en el puré de manzana o el jarabe líquido según corresponda, previa calibración con soluciones buffer de pH 4 y 7.

6.2.3.5 Acidez titulable

La acidez de la fruta se obtiene usando el método 942.15 (37.1.37) del AOAC (1996), el método se basa en la titulación de un puré de manzana, con solución de NaOH 0.1 N valorada previamente, hasta el vire de fenolftaleína como indicador ácido-base y/o un valor de pH de 8.0 ± 0.2 . El resultado de la titulación se expresa como kg de ácido málico / kg de muestra.

6.2.3.6 Índice de madurez

Se expresa como el cociente de sólidos solubles y acidez titulable de la fruta.

6.2.3.7 Humedad

La humedad de la fruta se determina por secado y diferencia de pesos de acuerdo al método 934.06 (37.1.10) del AOAC (1996). El contenido de humedad en la muestra se expresa como porcentaje en base húmeda.

6.2.3.8 Color

Para cuantificar el color en las placas de manzana fresca (control) y en las placas de manzana impregnada se usa el colorímetro color Gard System 05, usando los parámetros L (Luminosidad), a (rojo a verde) y b (amarillo a azul) de la escala Hunter. Se selecciona en el equipo la medición de color por la escala de L, a y b simple, se calibra a cero con el Cero Reference Estándar y con el color blanco con valor de L = +92.89, a = -1.05, y b = +0.82. Se realizan 3 mediciones en diferentes puntos de la placa de manzana. La diferencia neta del color (ΔE) se calcula como sigue:

$$\Delta E = (L_o - L)^2 + (a_o - a)^2 + (b_o - b)^2$$

Donde L_o , a_o , b_o , son los valores correspondientes a la manzana fresca y L, a, b, corresponden a la fruta impregnada.

El croma se calcula:

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

6.2.3.9 Contenido de sorbato de potasio

Se usa el método 20.118 del AOAC el cual consiste en una destilación por arrastre de vapor, seguida de una oxidación a malonaldehído que finalmente se hace

reaccionar con ácido tiobarbitúrico para formar un pigmento al cual se le mide la absorbancia a 532 nm. La concentración se determina en base a la curva estándar.

El procedimiento es pesar 1.5 – 2 g de muestra en un tubo digestor (tubo de ensaye grande), se agregan 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N y 10 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), se lleva a cabo la destilación, manteniendo un volumen de 20 – 30 ml en el tubo digestor con flama pequeña, se colectan de 100 a 125 ml del destilado y se afora a 250 ml. Para la oxidación se hacen reaccionar 2 ml del destilado aforado, 1ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.3 N, 1ml de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_4$) en tubos de ensaye, por 5 min en agua en ebullición; se enfrían en baño de hielo, se agregan 2 ml de sln. de ácido tiobarbitúrico a cada tubo y se calienta por 10 min en agua en ebullición, finalmente se lee la absorbancia. Para la curva estándar se hacen soluciones de 500 ml con alícuotas de 5, 10 , 15, 20, 25, 40, 45 ml de sln. stand. de ácido sórbico, se lleva a cabo la oxidación y la reacción con el ácido tiobarbitúrico como se explico anteriormente para las muestras.

Para elaborar la sln. de ácido tiobarbitúrico se disuelven 250 mg de ácido tiobarbitúrico en 5 ml de NaOH 0.5N en un matraz volumétrico de 50 ml, agitando sobre un baño de agua caliente. Se añaden 20 ml de agua y se neutraliza con 3 ml de HCl 1 N. Finalmente se afora y esta solución se debe preparar diario.

6.2.3.10 Contenido de calcio y zinc

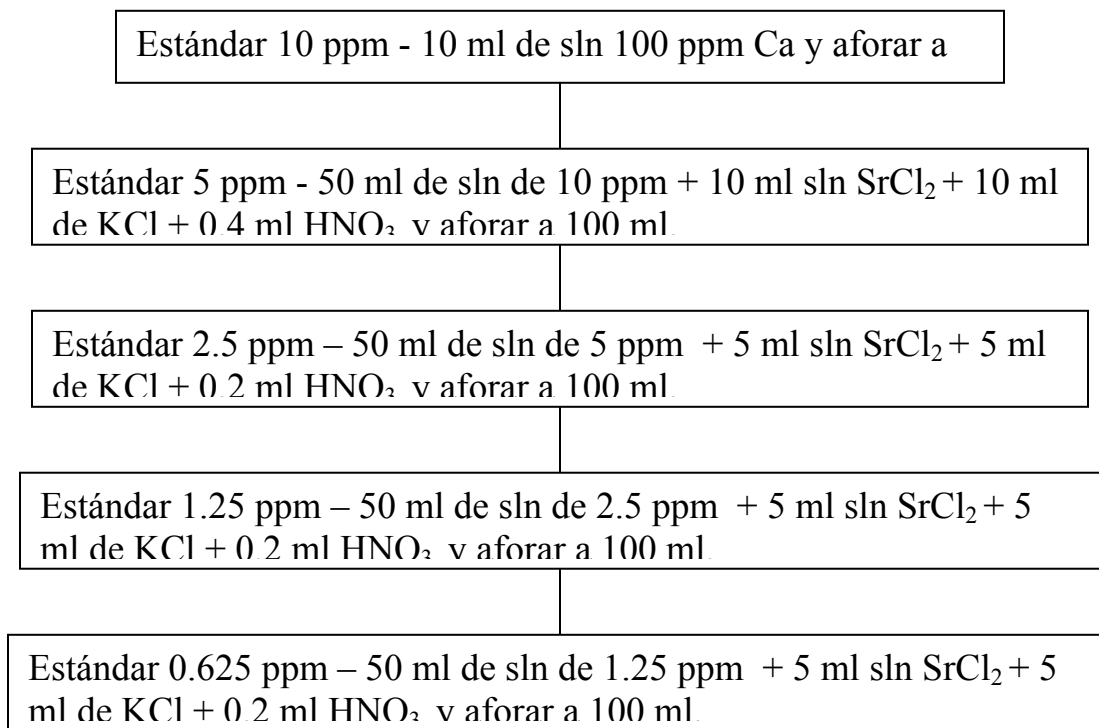
Se coloca el puré de manzana obtenido de la manzana fresca o tratada en un crisol a peso constante lo más lleno posible (aprox 30 g) y se registra el peso. Se coloca el crisol con muestra en la estufa por 24 h a 70 °C para después ser calcinada en la mufla a 450 °C por 24 h. Se dejan enfriar las cenizas, se pesan y se disuelven con 2 ml de HNO₃ (1:1), se colocan en un matraz aforado de 50 ml. Se realizan las diluciones necesarias (2/50 ml) para que las muestras estén en el rango de la curva estándar y se prosigue a realizar lecturas por absorción atómica con flama con el espectrofotómetro Spectraa 220 FS marca Varian para cada mineral.

6.2.3.10.1 Determinación del contenido de calcio

El calcio se determina usando el método 3.013 de la AOAC (1994), por espectrofotometría de absorción atómica para lo cual se ocupa la lámpara para calcio y una flama de oxido nitroso-acetileno con una longitud de onda de 422.7 nm y un ancho de banda de 0.5 nm.

Para la preparación de los estándares de calcio usados para la curva de calibración se usa una solución estándar de 10000 ppm de calcio soluble marca Merck , una solución de estroncio de 50 000 mg/l que se prepara pesando 9 g de SrCl₂ (reactivo analítico) seco y aforando a 100 ml, una solución de potasio de 50 000 mg /l que a su vez se prepara pesando 9.53 g de KCl seco y aforando a 100 ml, y una solución 1:1 de HNO₃ . Los estándares se preparan por diluciones sucesivas comenzando con uno de 10 ppm de Ca hasta llegar al de 0.625 ppm según la figura 3.

Figura 3. Diagrama de preparación de los estándares para la curva de calibración de Ca



Las cenizas se acidifican con HNO₃, se hacen las diluciones necesarias (2 / 50 ml) se agregan los 5 ml de sln SrCl₂ + 5 ml de KCl + 0.2 ml HNO₃, se afora a 50 ml y se leen las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica.

6.2.3.10.2 Determinación del contenido de zinc

El contenido de zinc se determina por absorción atómica con el método 3.013 de la AOAC (1994). Se usa la lámpara de zinc y se trabaja a 213.8 nm con una flama de aire - acetileno, con un ancho de banda de 1.0.

Se usa un estándar de zinc marca Merck (9953 Titrisol) hecho a base de cloruro de zinc con 0.06 % de HCl y concentración final de $1000 \pm .002$ mg / l de zinc. Para la curva de calibración las soluciones se preparan como indica la tabla V, para la lectura de las muestras se usan las mismas diluciones hechas para la determinación de Ca.

Tabla V. Preparación de los estándares para la curva de calibración Zn *

Estándar	Concentración (ppm)	Vol. Soln. Stock (ml)	Vol. Soln. Sr (ml)	Vol. Soln. K (ml)	Vol de HNO ₃ (ml)
0	0	0	10	10	0.4
1	0.6	0.06	10	10	0.4
2	1	0.1	10	10	0.4
3	2	0.2	10	10	0.4
4	3	0.3	10	10	0.4

*Aforando a 100 ml con agua destilada

6.2.3.11 Textura

Se determina la textura de la fruta fresca y tratada con un texturómetro TA – TX2 haciendo una prueba de penetración para la cual se usa una aguja de 5 mm de diámetro, velocidad de prueba 1 mm/s y una distancia de 20 mm; se cuantifica el pico máximo de penetración o fuerza máxima que está expresado en g y la fuerza por

tiempo requerida para deformar la fruta o área bajo la curva la cual se expresa en g.s.
La prueba se hace por triplicado y se calcula el promedio.

6.2.4 Evaluación sensorial

Se usa una escala hedónica donde se le da a cada juez una muestra de cada uno de los 4 productos donde se le pide que evalúe sabor y textura.

6.2.5 Análisis microbiológico

La siembra se realiza por duplicado, se toman 1 g de puré de fruta al cuál se le adiciona 9 ml de agua peptonada estéril en un tubo de dilución, y se realiza la siembra en profundidad, las cajas se incuban (Incubadora , Imperial III, Illinois, EUA) a 35 °C, durante 2 días, en agar nutritivo para determinar mesófilos y para hongos y levaduras la incubación es a 25 °C por un periodo de 5 días en agar PDA acidificado con 1ml de ácido tartárico por cada 100 ml de agar. El conteo de colonias se hace a ojo.

6.2.6 Evaluación de la estabilidad del producto seleccionado

Para el estudio de estabilidad durante el almacenamiento de las placas de manzana se empacaron 5 placas por paquete y se sellaron al vacío (0.77 bar, 57 cm

Hg) en bolsas laminadas de 5 x 5 in llamadas *pouches* de la marca Cryovac modelo PC7235B cuya transmisión de vapor de agua es 9 gr/m²/día y de oxígeno es de 3 cc/m²/día. Se hace un análisis del cambio de las propiedades fisicoquímicas como son pH, aw, color, textura, aceptabilidad sensorial, calcio, zinc, sorbato de potasio y carga microbiana por un periodo de 90 días a 5 °C y 14 a 25 °C de manera simultánea.