

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material Experimental

La fresa (*Fragaria ananassa*) utilizada en este proyecto fue variedad “Festival” (Figura 3), cultivada en la región de Atlixco, Puebla. La fruta se almacenó en refrigeración (5°C) durante 24 horas después de su cosecha y posteriormente fue tratada.



Figura 3. Fresa (*Fragaria ananassa*) variedad “Festival”.

5.1.2 Material

Agar nutritivo

Agar papa dextrosa (PDA)

Aceite de Oliva comercial (extravirgen) Kirland

Acido acético glacial (Sigma)

Etanol 96°

Gases: O₂(Oxígeno extraseco 99.5% MIN. UN 1072 INFRA), CO₂ (Dióxido de carbono extraseco UN 1013 INFRA), N₂ (Nitrógeno UN1066 con una pureza del 99.998% MIN. INFRA) y Helio cromatográfico INFRA.

Glicerol (Sigma)

Polietilenglicol (Sigma)

Nopal verdura (*Opuntia ficus indica*) variedad “Criollo”

Peptona de carne

Quitosano grado comercial (Sigma) (desacetilación mayor al 80% y material insoluble menor al 0.5%)

Solución de NaOH 0.1 N

5.1.3 Equipo

Analizador de textura (Texture Technologies Corp., modelo TA.XT2i, EUA)

Cajas Petri (10 y 14.1 cm de diámetro)

Cajas de poliestireno cristal REYMA ranuradas. Capacidad 1 litro.

Cámara para medir la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR)

Campana de esterilización (LABCONCO. EUA)

Celda de permeación de acero inoxidable

Colorímetro Colorgard System/05 (Gardner Laboratory modelo 05, EUA)

Cromatógrafo de gases Varian modelo 3000 (USA) con un detector de conductividad térmica (TCD)

Estufa, Cole-Parmer Instrument Company, EUA

Estufa MAPSA Modelo HDP-334

Homogenizador IKA Ultraturrax T18 basic. IKA WORKS, Inc.

Incubadoras Blue M Electric Company, USA

Medidor de flujo Glimont Instruments

Micrómetro ORION DIN 863 I

Jeringa para gases

Portapelículas de acrílico

Potenciómetro (ORION, modelo 120^a, EUA)

Refractómetro (ATAGO, Co., Japón)

Secador de túnel Parmley Graham

Tubos para centrífuga 50 ml

5.2 Métodos

5.2.1 Caracterización de la materia prima

La fruta fue caracterizada de acuerdo a:

- **Contenido de sólidos solubles totales (°Bx).** Se tomaron 3 muestras de 2 fresas cada una, las cuales se molieron en un mortero, posteriormente, con un refractómetro ATAGO N1 (0-32°Bx) se midieron los sólidos solubles totales a la pulpa por triplicado.

- **Contenido de humedad.** Se determinó a través del método 22.013 del A.O.A.C. (1984). Se pusieron tres charolas de aluminio con arena lavada y un trozo de vidrio a peso constante, posteriormente, se colocó en cada una de ellas un peso conocido de puré de fresa (aproximadamente 2 g). Haciendo uso del trozo de vidrio, se mezcló perfectamente la arena con el puré dejando el trozo de vidrio dentro de la charola de aluminio. Se introdujeron las cajas en una estufa a 100 ± 2 °C y se mantuvieron ahí durante 24 h. Transcurrido este período, se colocaron las charolas en un desecador durante 20 min. Posteriormente se pesaron en una balanza analítica y se registró el peso. Se determinaron por triplicado los porcentajes de humedad de las muestras.
- **Acidez Titulable.** Titulación de la muestra (5 g) con solución de NaOH 0.1 N hasta llegar al pH 8.3 usando un pHmetro, ya que no se puede emplear el punto de vire de la fenoftaleína por el color de la muestra.

1 ml NaOH 0.1N = 0.0064 g ác. Cítrico

$$\%acidez = \frac{V * N * 0.064 * 100}{\text{peso.de.muestra.(g)}}$$

donde

V , ml NaOH usado para la titulación

N , normalidad de NaOH

- **Color.** El color superficial de las fresas se midió con un Colorímetro Hunter Lab Colorgard System/05 (Figura 4). Se registraron los parámetros L (luminosidad), a (rojo) y b (amarillo) de la escala de Hunter. Se midieron 2 puntos en cada fruta. Se tomaron 5 frutas para la caracterización y 5 para cada tratamiento. El tono ($\tan^{-1}(b/a)$) ha sido aceptado comúnmente para describir los cambios en color de frutas y verduras después de su cosecha (McGuire, 1992), por lo que se calculó y se incluyó en este trabajo.



Figura 4. Medición de color con Colorímetro Hunter Lab Colorgard System/05.

A partir de los parámetros se determinaron: la saturación (C), tono (h) y la diferencia neta de color (ΔE), con las siguientes fórmulas:

Saturación:

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Tono

$$h = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right)$$

Cambio neto de color

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

donde L_o , a_o y b_o son los parámetros de color de las fresas control.

- **Textura.** La firmeza de las fresas con y sin película se reporta como firmeza externa y se evaluó mediante un Analizador de textura (TA.TX2i) (Figura 5). El fruto se colocó sobre una caja de Petri y se utilizó una punta cilíndrica redondeada de 8 mm de diámetro, a una velocidad de 1 mm/s que recorrió una distancia de 12 mm. En cada fresa se tomaron mediciones en 2 puntos y se emplearon 5 frutos en cada tratamiento. La firmeza se reporta en términos de carga máxima (g_f).

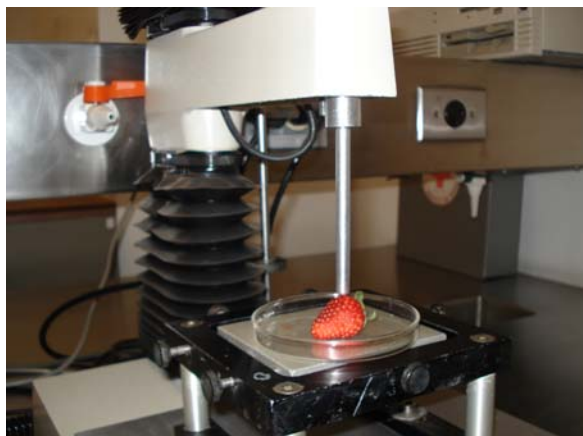


Figura 5. Medición de textura con analizador de textura (TA.TX2i).

Todos los análisis anteriores se emplearon tanto en la caracterización de la fruta fresca como en la evaluación de la fruta tratada durante su almacenamiento, incluyendo además, un registro para la pérdida de peso.

- **Pérdida de peso.** La pérdida de peso durante el almacenamiento de la fruta con y sin recubrimiento se monitoreó diariamente mediante los cambios en peso de 5 fresas para cada tratamiento.

5.2.2 Estandarización del proceso de obtención de mucílago de nopal

En la bibliografía se encontraron distintos procedimientos para la obtención del mucílago de nopal, por lo que se empleó una modificación hecha al procedimiento de Arizmendi (2004) quien a su vez también combinó la metodología propuesta por Forni et al. (1994) con las sugerencias de Medina-Torres et al. (2000), quedando como se muestra en la Figura 6.

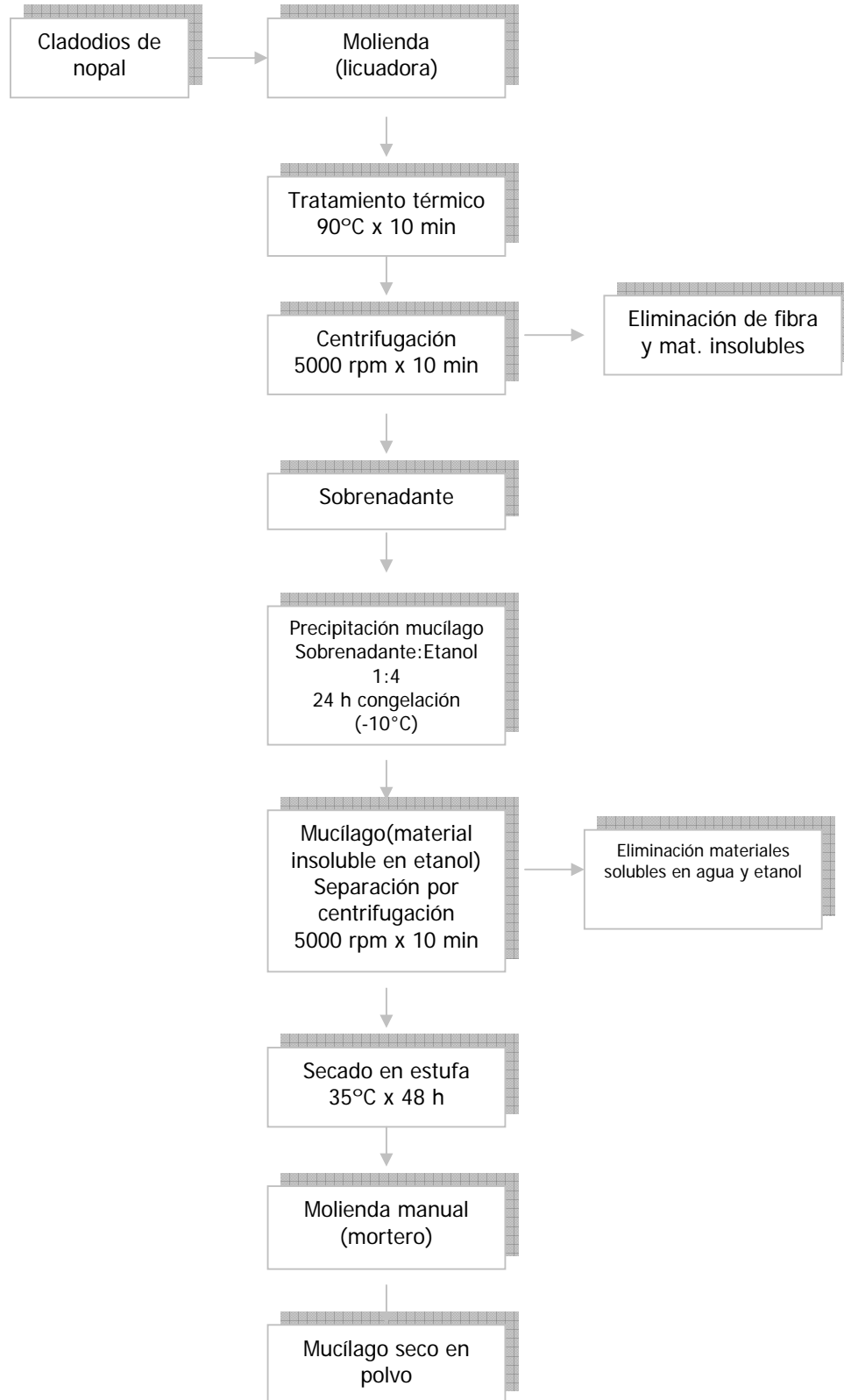


Figura 6. Proceso de extracción del mucílago de nopal.

5.2.3 Preparación de las soluciones formadoras de películas comestibles

5.2.3.1 A base de mucílago de nopal

La metodología utilizada siguió los lineamientos propuestos por Arizmendi (2004), quien mezcla cantidades determinadas de mucílago puro con agua destilada y agentes plastificantes (polietilenglicol/glicerol). Para este proyecto se seleccionaron dos formulaciones después de probar diferentes concentraciones de plastificantes y observar su comportamiento. El aceite de oliva se incluyó en una de las formulaciones, ya que es un plastificante que ha sido empleado en las películas comestibles de quitosano elaboradas en trabajos anteriores. Para ambas formulaciones, las cantidades de los componentes están calculadas por cada 25 ml de agua destilada.

Formulación 1 (MAG)

- 1 g mucílago seco en polvo
- 1.0 % (v/v) aceite de oliva
- 1.0% (v/v) glicerol

Formulación 2 (MPG)

- 1 g mucílago seco en polvo
- 1.0% (v/v) polietilenglicol
- 1.0% (v/v) glicerol

Los componentes se mezclaron a temperatura ambiente con ayuda de un homogenizador de laboratorio (Ultraturrax T18 basic. IKA WORKS, Inc.) (Figura 7) durante 10 minutos a 14000-18000 rpm, asegurándose que el mucílago se incorporara bien y no se quedara adherido a las paredes del vaso.

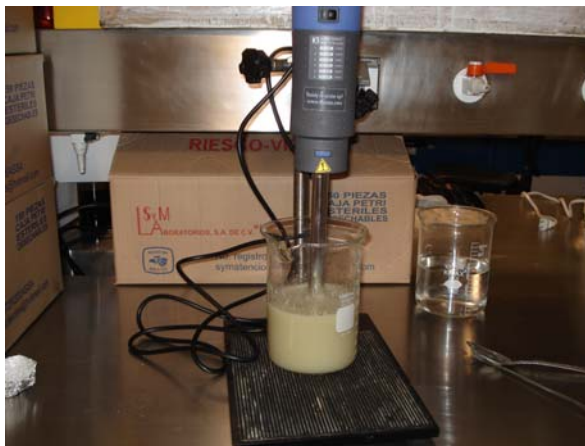


Figura 7. Homogenización de la solución formadora de película

Posteriormente, se hizo vacío (Figura 8) a la solución para evitar que quedaran burbujas de aire atrapadas que pudieran ocasionar perforaciones en la película durante el período de secado y que afectaran a su caracterización. Las soluciones resultantes (Figura 9) se emplearon para formar las películas que fueron caracterizadas y utilizadas para aplicar uno o dos recubrimientos a la fruta.



Figura 8. Eliminación de burbujas de aire.

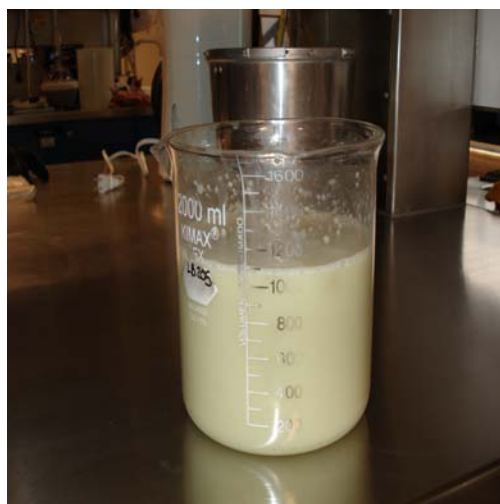


Figura 9. Solución formadora de película.

5.2.3.2. A base de quitosano

La solución se preparó basándose en el método modificado propuesto por Chen et al. (1996) y el cual ha sido aplicado anteriormente en diferentes proyectos realizados en la Universidad de las Américas-Puebla relacionados con películas de quitosano, siendo el procedimiento como sigue:

A. Para obtener 100 ml de solución de quitosano, se prepara previamente una solución de ácido acético al 2.5% (v/v) a la que se le agrega el plastificante (0.6 ml de aceite de oliva).

B. Se calienta la solución a 80°C y con la ayuda de un homogenizador (Ultraturrax T18 basic. IKA WORKS, Inc.) se incorpora lentamente 1 g de quitosano hasta obtener la solución formadora de la película, aproximadamente 10 min a 14000-18000 rpm.

C. Se hace vacío a la solución de quitosano para eliminar todo el aire atrapado, con el fin de formar películas homogéneas que puedan ser caracterizadas, es decir, libres de perforaciones.

5.2.4 Formación de las películas comestibles

5.2.4.1 A base de mucílago de nopal

Para contar con tres espesores distintos de cada una de las películas durante la caracterización de las mismas, la solución formadora de película se colocó en volúmenes de 40, 50 y 60 ml sobre cajas de Petri plásticas de 14.1 cm de diámetro y se dejó secar a 35°C durante 48, 60 y 72 horas respectivamente. Una vez secas las películas se almacenaron en un desecador a una humedad relativa del 75% por lo menos 24 horas antes de su uso. Las películas elaboradas con la primera formulación fueron identificadas como MAG-40, MAG-50 y MAG-60, mientras que las hechas a base de la segunda formulación se identificaron como MPG-40, MPG-50 y MPG-60.

5.2.4.2 A base de quitosano

Al igual que en las películas de mucílago de nopal, se colocaron 40, 50 o 60 ml de la solución de quitosano sobre una caja de Petri de 14.1 cm de diámetro y éstas se introdujeron en una estufa convencional a una temperatura de 40°C. Las películas con 40 ml de solución tardaron entre 10 y 12 horas para secar; entre 16-18 horas, las de 50 ml de solución y entre 20 y 24 horas, las de 60 ml de solución. Una vez secas las películas se almacenaron en un desecador a una humedad relativa del 75% por lo menos 24 horas antes de su uso. Las películas fueron identificadas con Q-40, Q-50 y Q-60.

5.2.5 Caracterización de las películas comestibles

5.2.5.1 Transmisión de luz (Color)

Para medir el color de las películas se utilizó el colorímetro Colorgard System/05 con el aditamento de transmitancia. Los parámetros evaluados fueron: L (luminosidad), a (contribución rojo-verde) y b (contribución azul-amarillo) de la escala de Hunter en 9 películas para cada formulación con diferente volumen de solución formadora. Las películas se colocaron en un juego de arillos de acrílico de 3.9 cm de diámetro que las mantienen extendidas e inmóviles al unir ambos arillos con tornillos, de tal forma que se

pueda medir la transmitancia de las película. Todas las películas se midieron del lado liso, es decir, del lado que estuvo en contacto con la caja de Petri. A partir de los parámetros se determinaron: la saturación (C) y el tono (h).



Figura 10. Medición de color de las películas comestibles.

5.2.5.2 Espesor

Para medir el espesor se empleó un micrómetro DIN 863 I. Se tomó la lectura en 15 puntos de cada película, evaluando seis de ellas para cada una de las formulaciones y volumen de solución formadora de película. El espesor se reportó en μm .

5.2.5.3 Propiedades mecánicas

Las películas se colocaron al igual que para la medición de la transmisión de luz, en un juego de arillos de acrílico de 3.9 cm de diámetro que las mantienen extendidas e inmóviles al unir ambos arillos con tornillos (Figura 12).



Figura 11. Medición de parámetros de textura de películas comestibles.

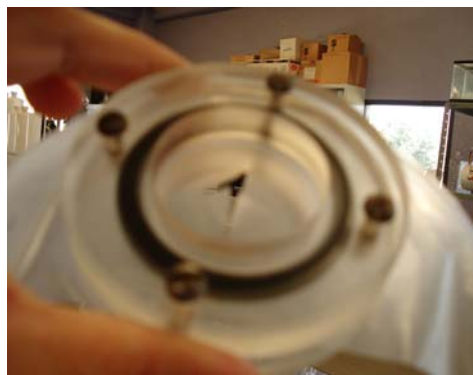


Figura 12. Arillos de acrílico para sujetar las películas comestibles.

Se utilizó el texturómetro TA-XT2i (Figuras 11 y 12) para llevar a cabo las mediciones de las propiedades mecánicas de las diferentes películas:

- A. Fuerza de rompimiento (g_f):** fuerza máxima necesaria para que se rompa la película,
- B. Elongación o elasticidad:** distancia de estiramiento (mm) de la película hasta antes de romperse,
- C. Área bajo la curva (fuerza vs elongación) ($g_f s$):** trabajo realizado para romper la película y
- D. Gradiente (g_f/s) de la pendiente o dureza de la película:** pendiente de la gráfica fuerza vs tiempo.

Se empleó el cabezal de 0.4 cm de diámetro a una velocidad de 1 mm/s y una distancia recorrida de 5-12 mm. Se evaluaron seis películas para cada formulación y volumen de solución formadora.

5.2.5.4 Propiedades de barrera

5.2.5.4.1 Velocidad de transmisión al vapor de agua (VTVA) y Permeabilidad (k/x)

La permeabilidad al vapor de agua se evaluó por medio del método E 96-87 (ASTM, 1989), empleando cloruro de calcio ($CaCl_2$) como desecante (el cual es deshidratado previamente en una estufa a $35^\circ C$: 0% HR, 0 mmHg de presión de vapor de agua). A cada una de las películas empleadas para esta medición se le midió su espesor. Se registraron los diámetros de los pesamuestras y se les agregaron 15 g de $CaCl_2$ granular. La película se colocó sobre el borde superior de cada recipiente y se sujetó con parafilm. Posteriormente, los pesamuestras se colocaron en un desecador (Figura 13) que contenía una solución saturada de NaCl (generando una a_w de 0.75), se tapó, se le hizo un vacío parcial y se introdujo en una estufa a temperatura constante ($20^\circ C$: 17.82 mmHg de presión de vapor de agua).



Figura 13. Cámara para evaluar la velocidad de transferencia al vapor de agua (VTVA).

Se registró la ganancia de peso del CaCl_2 cada 8 horas durante 3 días por triplicado y con esos datos se generó una gráfica de la ganancia de peso en función del tiempo, de la cual se obtuvo la pendiente. A partir de este valor se pudo determinar la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA), así como la permeabilidad (k/x) con las siguientes ecuaciones:

VTVA: Gramos de vapor de agua transmitidos a través de 1 m^2 de película en 24 h.

$$\text{VTVA} = \frac{24(m)}{(t)(A)} = \frac{\text{g}}{\text{h m}^2}$$

Donde:

m = masa ganada o perdida (g)

t = tiempo (horas)

A = área expuesta de la película (m^2)

Permeabilidad (k/x)

$$k/x = \frac{\text{VTVA}}{P_{\text{fuera}}}$$

P_{fuera} = Presión de vapor saturado a la temperatura usada x (%HR/100)

5.2.5.4.2 Permeabilidad a gases

A. Permeabilidad al O₂

Para determinar la permeabilidad de las películas se empleó el método de permeación diferencial que se describe en la Figura 14. El método consiste en colocar una película en la celda de tal forma que genere una división y se formen dos cámaras. En cada cámara se hace circular una corriente gaseosa. Una de estas corrientes es del gas analizado (gas permeante), que primeramente fue O₂, mientras que la otra corriente contiene un gas vector, N₂, ambos a presión atmosférica. El gas permeante que atraviesa la membrana es arrastrado de la membrana por el gas vector. Esta última corriente (Gas vector, N₂) se analiza por cromatografía de gases para determinar la cantidad de gas permeante que atraviesa la membrana. La evaluación se llevó a cabo a temperatura ambiente.

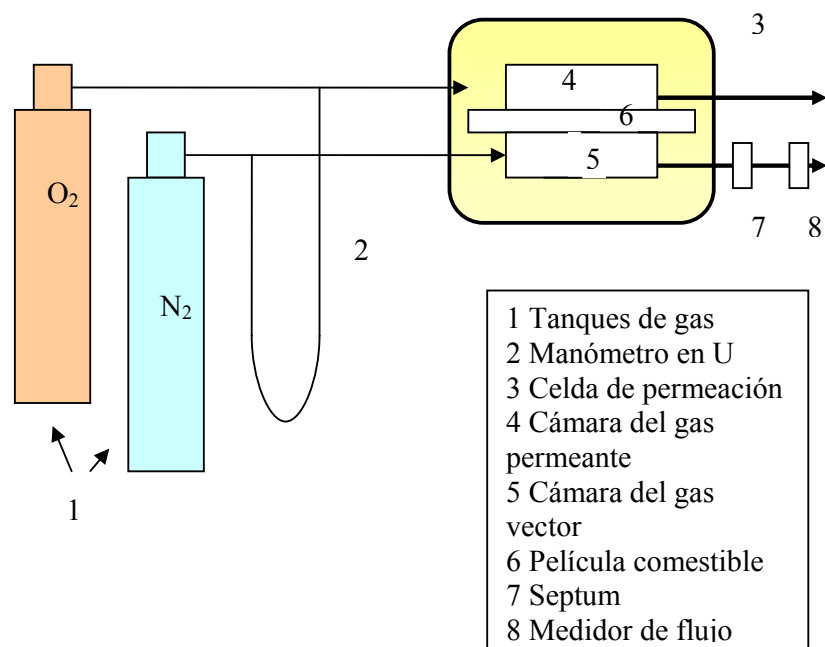


Figura 14. Sistema para medición de la permeabilidad a gases (O₂ y CO₂) de las películas comestibles.

La permeabilidad (P), considerando un estado estacionario, se calculó a través de la ecuación (5). El flujo de los gases en las cámaras se mantuvo constante y ambos flujos alimentaron directamente a las dos cámaras de la celda de permeación.

Con ayuda de una jeringa para gases se tomó una muestra de 1 ml del gas vector a través de un septum colocado a la salida de la celda cada 5 minutos durante una hora. La muestra se inyectó manualmente al cromatógrafo de gases y se evaluaron por triplicado cada una de las diferentes películas.

La columna utilizada en el cromatógrafo para detectar O₂ fue una Varian Molesieve 5A (USA) y las condiciones bajo las cuales operó este equipo fueron:

- Gas acarreador: Helio a 10 psi de presión
- Temperatura de la columna: 50 °C
- Temperatura del detector: 80 °C
- Temperatura del inyector: 80 °C
- Corriente del filamento: 130 mA

Las áreas bajo la curva del gas permeado que se obtuvieron del sistema integrador conectado al cromatógrafo fueron transformadas a porcentajes del gas analizado mediante una curva estándar.

Curva Estándar: Para cada uno de los gases evaluados se realizó una curva estándar (Apéndice J). Se utilizó una cámara de 4 100 ml de volumen, que se llenó con porcentajes conocidos de O₂ o CO₂ y N₂ como volumen restante. Se tomaron muestras por triplicado de 1 ml de la mezcla contenida en la cámara a través de un septum y se inyectaron en el cromatógrafo para obtener el área bajo la curva del gas en cuestión. Este procedimiento se repitió seis veces. Con las áreas bajo la curva (ABC) obtenidas del cromatógrafo y los porcentajes conocidos del gas, se generó una curva (ABC vs %O₂ o CO₂ (v/v)). La ecuación de dicha curva se utilizó para transformar las ABC obtenidas en la etapa de evaluación de la permeabilidad de las películas comestibles en porcentajes de gas permeado a través de ellas. Con esta información fue posible calcular la velocidad de transferencia o permeabilidad (P/x) al gas en cuestión de las películas comestibles hechas a base de mucílago de nopal y quitosano.

B. Permeabilidad al CO₂

Todo el procedimiento y las condiciones de trabajo fueron exactamente iguales que en el caso del O₂, lo único que cambió fue la columna empleada en el cromatógrafo, que en ese caso se utilizó una Varian Hayesep N 80/100 (USA).

5.2.6 Aplicación de las películas comestibles en fresa

Las fresas variedad “Festival” procedentes de la región de Atlixco, Puebla, se adquirieron a 3 horas de ser cosechadas y se llevaron al laboratorio en canastos, los cuales se mantuvieron en refrigeración (4 °C) durante un día antes de dar los tratamientos a la fruta. Para recubrir la fruta se realizaron algunos pasos previos al recubrimiento como se menciona a continuación.

5.2.6.1 Selección de los frutos y formación de lotes.

Se inspeccionaron uno por uno todos los frutos y se aceptaron aquellos que tenían una textura firme, color homogéneo y que estuvieran libres de daños mecánicos o causados por alguna plaga (Figura 15).



Figura 15. Selección de la fruta.

Se formaron siete lotes de fruta (Figura 16), uno para ser empleado como control y los otros seis fueron recubiertos con una o dos capas de las 3 películas comestibles.



Figura 16. Formación de lotes homogéneos para cada uno de los tratamientos.

5.2.6.2 Desinfección de los frutos

Antes de la aplicación de las películas comestibles, las fresas fueron lavadas con agua limpia y se sumergieron en una solución de cloro comercial (50 ppm, recomendación hecha por la Secretaría de Salud México, 2001) durante 10 min, posteriormente se escurrieron y se dejaron sobre papel absorbente nuevamente por un período de 10 minutos (Figura 17).



Figura 17. Desinfección de la fruta en solución de cloro comercial.

5.2.6.3 Recubrimiento de los frutos

Las fresas (*Fragaria ananassa*) se recubrieron, sumergiéndolas por 30 segundos en las soluciones de quitosano (Q) o de mucílago de nopal (MAG o MPG) y colocadas en una charola perforada para escurrir el sobranadante de la solución formadora de película (Figura 18).



Figura 18. Recubrimiento de los frutos con las soluciones formadoras de película.

Las fresas se secaron en 2 períodos de 10 minutos en un secador con aire (Figura 19) a una velocidad de 1.4 m/s y a una temperatura de 25°C. Se requirió voltear la fruta para asegurar que se secase completamente la película aplicada. Este procedimiento se realizó dos veces en las fresas que tenían que ser recubiertas con dos capas de la película en cuestión.



Figura 19. Proceso de secado de la fruta.

5.2.6.4 Empacado de la fruta recubierta

Las fresas (*Fragaria ananassa*) con o sin película comestible completamente secas fueron empacadas en cajas de poliestireno cristal (domos para ensalada con capacidad de 1 L) REYMA, previamente ranuradas tanto en la base como en la tapa.

5.2.6.5 Almacenamiento

Las fresas (*Fragaria ananassa*) empacadas fueron almacenadas en condiciones de refrigeración (4°C y 85% HR) durante 21 días (Figura 20).



Figura 20. Almacenamiento de la fruta tratada.

5.2.7 Evaluación del efecto del uso de las películas comestibles a base de quitosano y mucílago de nopal

5.2.7.1 Análisis físico-químicos

Los parámetros a evaluar durante este período fueron: °Bx, acidez titulable, pH, textura y color. Las técnicas empleadas están descritas en la sección de la caracterización de la materia prima.

5.2.7.2 Análisis microbiológicos

Se empleó la técnica de recuento en placa para la cuantificación de microorganismos, utilizando agar nutritivo para mesófilos aerobios incubando a 35°C por 48 horas, mientras que para hongos y levaduras se utilizó agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10% incubando a 25 °C por 72 horas.

5.2.7.3 Evaluación sensorial

Se realizó una prueba de nivel de agrado a través de una escala estructurada hedónica de 9 puntos, desde (1) Me gusta muchísimo hasta (9) Me disgusta muchísimo. Las variables a evaluar fueron: aroma, color, sabor, textura (tocar/degustar), apariencia y calidad general.

Jueces: Los jueces participantes en las pruebas fueron estudiantes y personal administrativo de la Universidad de las Américas, Puebla, siendo la selección de ellos basada en la disposición de tiempo de éstos. Un total de 20 jueces (ambos sexos) fueron necesarios para la realización de esta prueba.

Estímulo: Se empleó una fresa entera sin hojas como muestra por juez. La fruta se colocó sobre platos de plástico desechables, de los cuales los jueces observaban y tomaban la fruta.

Procedimiento: Antes de iniciar la prueba, se les dieron verbalmente a los jueces, las instrucciones sobre la metodología a seguir, además de tener dichas instrucciones impresas en la hoja de evaluación (Apéndice

A). Posteriormente, los jueces llevaron a cabo la evaluación sensorial y marcaron con una X sobre la línea que expresaba mejor su nivel de agrado para cada uno de los atributos (Figura 21).



Figura 21. Ejecución de la evaluación sensorial de fresas recubiertas con películas comestibles a base de mucílago de nopal y quitosano.

5.2.8 Análisis Estadístico

Se llevo acabo un análisis estadístico para las variables respuesta de la caracterización de la materia prima y de las diferentes películas comestibles, así como de la evaluación de la fruta recubierta durante su almacenamiento, haciendo uso del software MINITAB Release 14. Se aplicaron análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones usando la Prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los valores reportados para las variables evaluadas con la misma letra no son significativamente diferentes.