

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. *Materiales*

8.1.1. *Fruta*

Fresas fisiológicamente maduras *Fragaria x ananassa* cv. Festival (Figs. 16 a y b) fueron cosechadas en una hortaliza local (Atlixco, Pue.) y transportadas directamente al laboratorio. Las fresas se lavaron con agua destilada para quitar tierra y otras partículas. Se pusieron en toallas absorbentes, con otra toalla encima y se dejaron secar por 15 min. Las fresas utilizadas para el tratamiento se seleccionaron para que fueran de tamaño similar, con el mismo grado de madurez y libres de golpes.

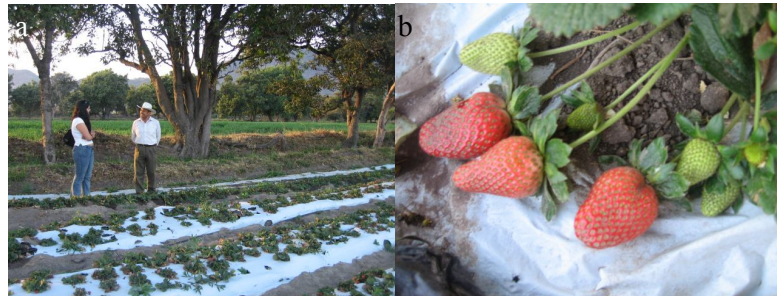


Figura 16. (a) hortaliza de fresas (b) fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Festival)

8.1.2. Microorganismos

La cepa de *Botrytis cinerea* fue donada por la Dra. Rosalba Troncoso, de la colección del CIAD (Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos), Hermosillo, Son.

8.1.3. Sistema modelo y fresa estéril para cinética de muerte microbiana

El sistema modelo de fresa (SMF) se obtuvo adicionando a un buffer de fosfato (para simular las sustancias buffer de la fresa) los porcentajes de azúcares y ácidos orgánicos reportados por Kafka *et al.* (2007) del híbrido 8 de fresa que presentó un pH, acidez titulable y °Brix similares a los de la fresa cv. Festival usada para los tratamientos con microondas; con un pequeño ajuste en el porcentaje de ácido cítrico para evitar que el pH bajara demasiado; la composición usada se muestra en la tabla X. El SMF se esterilizó por medio una membrana de 0.45µm en un recipiente de vidrio previamente esterilizado el cual se mantuvo herméticamente cerrado y en refrigeración.

Tabla X. Composición del sistema modelo de fresa

Compuesto	Porcentaje (p/p)
Fructosa	4.20
Glucosa	2.00
Sacarosa	0.25
Acido Cítrico	0.70
Acido Málico	0.22
Acido Ascórbico	0.09

La puré de fresa estéril (FE) se obtuvo al licuar, en una licuadora previamente esterilizada, fresa almacenada a -18°C por 4 meses. El licuado se colocó en un recipiente cerrado de vidrio y se esterilizó a 101°C por 10 min según lo señalado por López-Malo, *et al.* (1995). A ambos sistemas se les caracterizó midiendo pH, °Brix y actividad de agua (a_w).

8.2. Métodos

8.2.1. Tratamientos térmicos

Determinación de las condiciones de tratamiento

Antes de aplicar los tratamientos se realizaron estudios preliminares para obtener las curvas de penetración de calor para el calentamiento hidrotérmico convencional y asistido con MO, con el fin de obtener el historial tiempo temperatura para ambos procesos y así determinar los protocolos de los mismos.

Para todos los tratamientos las frutas se sumergieron en un baño de agua-hielo a 4°C inmediatamente después de ser tratadas. La temperatura de enfriamiento se midió cada 30 s con termopares tipo T y un *data logger* (Digisense DualogR 991100-50, Cole-Parmer Instrument Co, EUA).

Diseño de los tratamientos térmicos

Se aplicó a las fresas un tratamiento hidrotérmico a 45°C por 15 min de acuerdo con lo reportado por García *et al.* (1995) y dos protocolos para tratamientos hidrotérmicos asistidos con MO (empleando 70 y 90% de la potencia máxima) fueron desarrollados para alcanzar una temperatura interna similar a la obtenida con el tratamiento convencional antes mencionado. Un conjunto de fresas fue dejado sin tratamiento como grupo testigo.

La tabla XI muestra los protocolos estudiados; cada tratamiento se realizó por triplicado.

Tabla XI Nomenclatura y descripción de los protocolos de tratamientos usados en fresas

Nomenclatura	Descripción
C	Sin tratamiento
H	Hidrotérmico a 45°C por 15 min
MO70	Hidrotérmico asistido con MO por 3 min 0s a 70% de potencia
MO90	Hidrotérmico asistido con MO por 1 min 50 s a 90% de potencia

Después de los tratamientos, las fresas se colocaron en un colador previamente desinfectado por 5 min para remover el exceso de agua y posteriormente fueron empacadas en contenedores de plástico PETE rectangulares con tapa resellable y agujeros de respiración para simular las condiciones de empaque comerciales. Las fresas empacadas fueron almacenadas a 3 ± 2 °C y 90% HR en un refrigerador *Ambi Hi — Lo Chambe* (Lab-line Instruments, EUA).

Tratamientos hidrotérmicos asistidos con microondas

Para los tratamientos asistidos con MO, 225 ± 25 g de fresas se sumergieron en agua destilada en una proporción 1:2.5 para ser calentados por 3 min en un horno de MO (1200 W, Panasonic, China) usando 70 o 90% de la potencia. La temperatura se registró cada 2 s introduciendo sensores de fibra óptica (FISO Technologies Inc., Quebec, Canadá) en la superficie y el centro de la fresa y se grabó con un software de adquisición (FISO Commander Workstation™ de FISO Technologies Inc., Quebec, Canadá).

Para el cálculo de la potencia de salida del MO a los dos porcentajes utilizados se realizó un estudio de acuerdo con el método del IEC (Martins, 2008). Se obtuvo una potencia de salida de 514.3 y 762.8 W para 70 y 90% de la potencia máxima, respectivamente.

Tratamientos hidrotérmicos

Para la curva del tratamiento hidrotérmico convencional se utilizaron termopares T previamente calibrados los cuales se colocaron en la superficie (bajo la piel de la fruta) y en el centro de las fresas. Después, 225 ± 25 g de fruta se sumergieron por 15 min en un baño de agua controlada (Poly Therm PY4(L), Science/Electronics Inc., EUA) a $45 \pm 0.4^\circ\text{C}$. Las temperaturas se registraron manualmente cada minuto con un *data logger* (Digisense DualLogR 991100-50, Cole-Parmer Instrument Co, EUA).

8.2.2. Determinación de los parámetros de físico-químicos y microbiológicos

Los análisis fisicoquímicos y de calidad se hicieron al tiempo 0 (previo al tratamiento), después del tratamiento y durante el almacenamiento tanto para las muestras testigo (no tratadas) como para las obtenidas de los diferentes tratamientos.

Las condiciones de almacenamiento fueron de refrigeración a 3 ± 2 °C y 90% HR en un refrigerador *Ambi Hi — Lo Chambe* (Lab-line Instruments, EUA, Fig. 17), que posee un sistema de refrigeración-calefacción. Además, para obtener el control de la humedad relativa a 90% se utilizó una solución salina de cloruro de sodio al 10% (v/v) siguiendo las ecuaciones de a_w -concentración reportado por Lopez-Malo *et al.* (1994).



Figura 17. Cámara de temperatura y humedad relativa controladas.

Los parámetros que se monitorearon fueron los cambios en sólidos solubles, pH, acidez titulable, índice de madurez, contenido de humedad,

firmeza, color y concentración de antocianinas a los 3, 6 y 9 días. Los análisis se realizaron por triplicado.

Sólidos solubles (°Brix)

Los sólidos solubles (SST) de la fresa se evaluaron usando el refractómetro digital *ATAGO IR— 1* (ATAGO, Japón) a 25 °C, y fueron expresados como °Brix.

pH

El pH de las fresas se determinó usando el potenciómetro *Orion 420* (Orion Research Inc., EUA) por el método 32.016 de la AOAC (1996) basado en la inmersión del electrodo.

Acidez titulable

La acidez titulable (AT) se obtuvo de acuerdo con el método 942.15 (37.1.37) de la AOAC (1996), basado en la titulación de aproximadamente 3 g de puré de la fruta, con solución de NaOH 0.1 N, valorada previamente, y usando un potenciómetro hasta alcanzar un valor de pH de 8.2 ± 0.2 . El resultado de la titulación se expresó como porcentaje de ácido cítrico y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ acidez} = \frac{V \cdot N \cdot \text{mili equivalentes}}{v} \quad (7)$$

Donde:

%acidez: g de ácido/100 ml de muestra

V: volumen (ml) de NaOH usado para la titulación

N: normalidad de NaOH

v: volumen (ml) de muestra

Mili equivalente: es la cantidad del ácido predominante en el alimento equivalente a 0.001 ml NaOH 0.1N que en el caso de ácido cítrico equivale a 6.4 g

Índice de madurez

Se calculó como el cociente de sólidos solubles y acidez titulable de la fruta (FAO, 2003).

Humedad

El contenido de humedad para fresas se determinó 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 expresó como porcentaje en base húmeda.

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso inicial (g)} - \text{peso final (g)}}{\text{peso inicial (g)}} * 100 \quad (8)$$

Firmeza

La firmeza se evaluó por triplicado con un analizador de textura *Texture Analyzer TA- XT2* (Texture Technologies, Reino Unido), haciendo una prueba de compresión en una pieza de fruta, para la cual se usó un émbolo de 8mm de diámetro que baja para comprimir a la fruta a 20 mm/min ó 0.33

mm/s en dos lados opuestos de la fresa, para obtener la fuerza o pico máximo que se necesita para romper el tejido de acuerdo con lo señalado por Civello *et al.* (1997). Con los datos se calculó la pérdida total de firmeza (PTF) con la siguiente ecuación:

$$PTF (\%) = (Firmeza \text{ día } 0 - Firmeza \text{ día } 9) * 100 / Firmeza \text{ día } 0 \quad (9)$$

Color

La cuantificación de color en el exterior de las fresas se hizo por triplicado con el colorímetro *Colorgard System 05* (Gardner Laboratory, EUA), usando los parámetros *L* (luminosidad), *a* (+ rojo, -verde) y *b* (+ amarillo, -azul) de la escala de Hunter. Para esto, el equipo se usó en el modo de reflectancia y se calibró con el mosaico negro y con el mosaico blanco. Posteriormente, se calcularon la diferencia neta de color (ΔE) y el tono o Hue (H) con las siguientes fórmulas:

$$\Delta E = (L_o - L)^2 + (a_o - a)^2 + (b_o - b)^2 \quad (10)$$

$$H = \tan^{-1}(b/a) \quad (11)$$

Donde L_o , a_o , b_o son los valores del testigo y L , a , b corresponden a las fresas tratadas.

Concentración de antocianinas

La concentración de antocianinas de las fresas se calculó de acuerdo con una adaptación del método descrito por Civello *et. al*, 1997, que consiste en

congelar 10 piezas de fresa a -18°C , las cuales fueron trituradas con un molino *Braun turbo 400* (Braun GmbH, España) en un recipiente cilíndrico de plástico inmerso en un baño de agua-hielo a 4°C , para después tomar 400 mg de dicho polvo y transferirlos a un tubo para centrifuga junto con 10ml de una solución HCl-metanol al 1% (v/v) manteniendo la mezcla a 0°C por 10 minutos en una cámara de temperatura controlada *Torrey R-14-B-IC* (Fabricantes para equipos de refrigeración S. A., México).

La mezcla fue después centrifugada en una centrifuga *Marathon 21K/R* (Fisher Scientific, Alemania) por 5 min a 4°C y 1500 g; para después tomar una pequeña muestra de aproximadamente 3 ml y colocarla en una celda para espectrofotómetro y medir su absorbancia a 515 nm con un espectrofotómetro *Shimadzu UV-160* (Shimadzu Corporation, Japón).

La cantidad de antocianinas en la fresa, expresada como la concentración de pelargonidina 3-glucosido, fué calculada por medio de la siguiente ecuación:

$$E_{\text{molar abs}} = 36\,000\ \text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1} \quad (12)$$

Donde:

$E_{\text{molar abs}}$: es la absorbancia dada por el centrifugado de fresa

M^{-1} : es la concentración molar de antocianinas expresada como pelargonidina 3-glucosido

cm^{-1} : es la longitud de onda a la cual fue medida la absorbancia en cm

Determinación de la calidad microbiológica

La calidad microbiológica fue determinada por el conteo de mohos y levaduras en la fruta. Las cuentas se obtuvieron siguiendo el método especificado por la NOM-111-SSA1-1994.

Actividad de agua (a_w)

La a_w de las muestras SMF y FE se determinó usando un higrómetro de punto de rocío (*Aqualab SE*, Decagon Inc. EUA) calibrado y operado como lo describen López -Malo *et al.* (1994).

8.2.3. Software para el análisis de datos

Para las gráficas y cálculos diversos se utilizó la paquetería de Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Co., EUA) y los análisis estadísticos se obtuvieron con Minitab® 14 (Minitab Inc., EUA) por medio de un ANOVA y una prueba de Tukey's para identificar si existía o no diferencia significativa entre los datos. Para todo análisis estadístico se utilizó una $p= 0.05$ como nivel significativo.

8.2.4. Determinación de la cinética de muerte microbiana

La determinación de muerte microbiana para *Botrytis cinerea* se hizo por medio de un análisis de tiempo de muerte térmico o TDT (Tiempo de muerte microbiana o Thermal Death Time, en sus siglas en inglés) que consiste en calentar una cantidad de microorganismos conocida en una solución a

diferentes temperaturas y varios intervalos de tiempo para cada temperatura, de tal manera que se pueda obtener una curva de cinética de muerte microbiana de la cual se puedan derivar los parámetros D y z (USDA, 2005).

Para ello se utilizaron celdas TDT que fueron diseñadas y construidas por la Washington State University (Fig. 18). Dichas celdas son de aluminio, la cavidad mide 18 mm de diámetro y 4 mm de profundidad, y tienen una capacidad de 1.27 mL. Algunas están equipadas con termopares tipo T para la medición de temperatura; la cual se grabó con un sistema de adquisición data logger (Digisense DualogR 991100-50, Cole-Parmer Instrument Co, EUA). Las celdas se llenaron con 100 μ L de inóculo y 900 μ L de SMF o FE, para dar una población inicial de 10^4 a 10^5 esporas/mL.

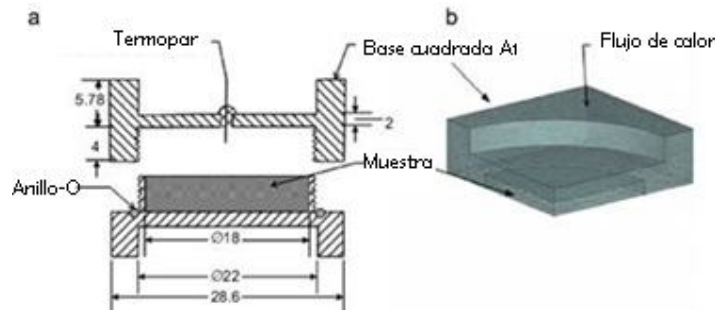


Figura 18. Celdas TDT de aluminio

El inóculo se obtuvo de acuerdo con el método señalado por Lichter *et al.* (2003) al sembrar *B. cinerea* en placas con agar papa dextrosa (PDA) dejándolas incubar por 12 ± 2 días a 25°C y recolectando las esporas con una solución limpiadora (0.7% de NaCl y 0.03% de tween 20) para después filtrar el lavado con 8 capas de gasa recolectándolo en un recipiente previamente

esterilizado y obtener una concentración entre 10^5 a 10^6 esporas/mL. Se utilizó inóculo fresco para cada análisis.

Cinco celdas inoculadas se sometieron a baños de agua a las temperaturas predeterminadas de 42, 44, 46 y 48°C con desviaciones de $0.2\pm^\circ\text{C}$; para después ir las sacando a diferentes intervalos de tiempo previamente determinados con análisis exploratorios. Las celdas se colocaron en un baño de agua-hielo inmediatamente después de ser sacadas y hasta el momento de su recuento.

El recuento de *B. cinerea* se realizó tomando 100 μL de la muestra tratada para hacer las diluciones pertinentes en agua peptonada al 0.1% para luego sembrar por vertido en placa en agar dicloran rosa de bengala (DRBC, Difco) y se dejaron incubar a 25°C por 5 días para hacer el recuento de la población sobreviviente.

Modelación de la cinética de muerte microbiana

Se modeló la cinética de muerte microbiana por medio de la ecuación de cinética de primer orden (FDA, 2000):

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (13)$$

Donde:

N: población microbiana a cualquier tiempo, t

N_0 : población microbiana inicial

D: tiempo de reducción decimal o tiempo necesario para reducir la población en un 90% a determinada temperatura

El parámetro z permite evaluar la termorresistencia de los microorganismos, es decir, los °C necesarios para incrementar o disminuir el valor de D a una décima parte. Para obtener el valor z se utilizó una curva de resistencia térmica en la cual se graficó el $\log D$ contra la temperatura, calculando a z como el inverso negativo de la pendiente de dicha curva (FDA, 2000):

$$\log (D/D_0) = (T_0 - T)/z \quad (14)$$

Donde:

D : es la reducción decimal a la temperatura T

D_0 : es la reducción decimal de referencia a la temperatura T_0