

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. MATERIA PRIMA

Los frutos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav) sendtn) se obtuvieron de la finca Zaracay ubicada en el municipio de Circasia, departamento del Quindío, Colombia, ubicada a 1500 m.s.n.m. con una temperatura entre 16 – 18 °C y con una humedad relativa de 72%. Los frutos se colectaron en condiciones similares de sanidad y madurez de acuerdo con la tabla de color y la norma NTC 4105. (ICONTEC 1997)



Figura 4: Cultivo de tomate de árbol finca Zaracay

## 5.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la experimentación se utilizaron frutos de tomate de árbol cuyo diámetro ecuatorial oscilaba entre  $50 \pm 5$  mm y el diámetro polar entre  $68 \pm 10$  mm, figura (5), con un peso entre 70 – 80 g, con grados Brix de  $9.0 \pm 0.5$  y grado de madurez 4 de acuerdo con la tabla de color.

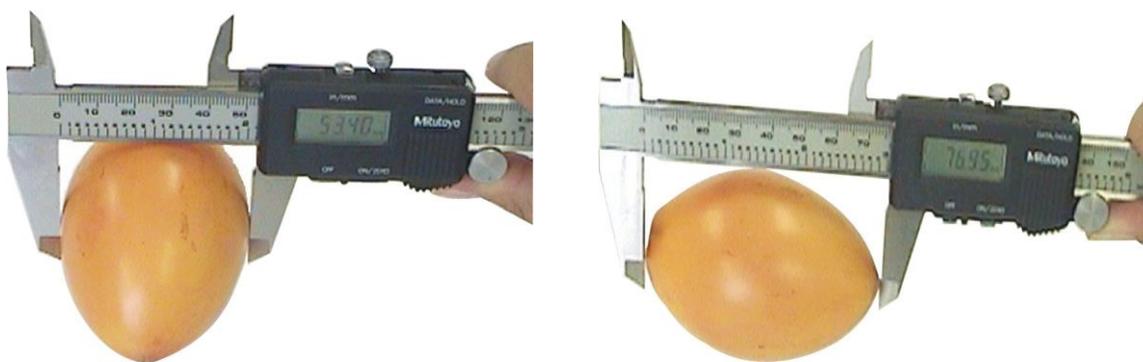


Figura 5: Medida de los diámetros ecuatoriales y polares

Los frutos seleccionados se sometieron al proceso de escaldado. Cada fruto fue sumergido entero en agua a punto de ebullición ( $92 - 95$  °C) durante 3 minutos, al cabo de los cuales se realizó un choque térmico sumergiendo los frutos en agua a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, para facilitar su pelado. A los frutos pelados, figura (6b) se les eliminaron las puntas figura (6c), se cortaron por el eje polar figura (6d), y las semillas se retiraron manualmente figura (6e), los trozos obtenidos tenían forma rectangular, que facilitaba la obtención de los trozos en la geometría seleccionada. (Rojas A., Arango L., 2004)

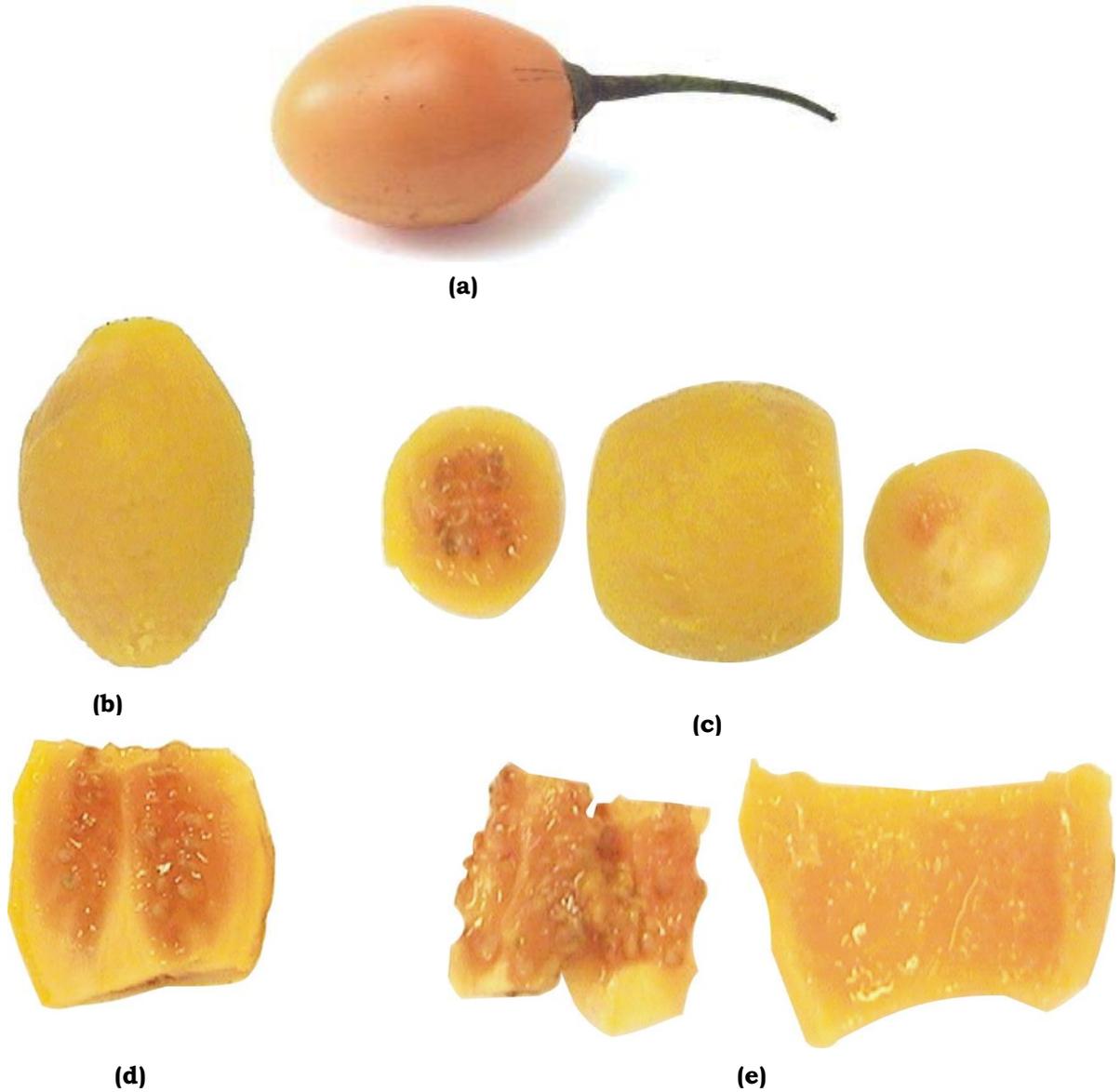


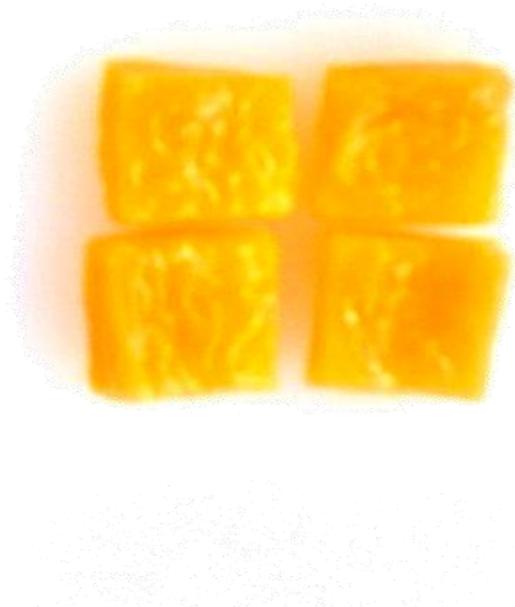
Figura 6: Esquema para la preparación de la muestra

Teniendo en cuenta la geometría de la fruta entera y la estructura interna de la misma, se seleccionó como forma geométrica más adecuada para el proceso de DO cubos deformados de aproximadamente  $2 \times 2 \times 0.5$  para facilitar el paso osmótico del jarabe a través de la fruta. Los cubos deformados se lograron utilizando una cortadora manual en acero inoxidable diseñada para tal efecto, figura 7a. De cada corte se obtenían 4

cubos deformados, figura 7b. El proceso de deshidratación osmótica (figura 7c) se realizó a presión atmosférica (640 mmHg) en condiciones de temperatura ambiente entre 22 y 25 °C, con una humedad relativa del 75%. Para este proceso, se detalla el siguiente diagrama de flujo (figura 7e):



**(a)**



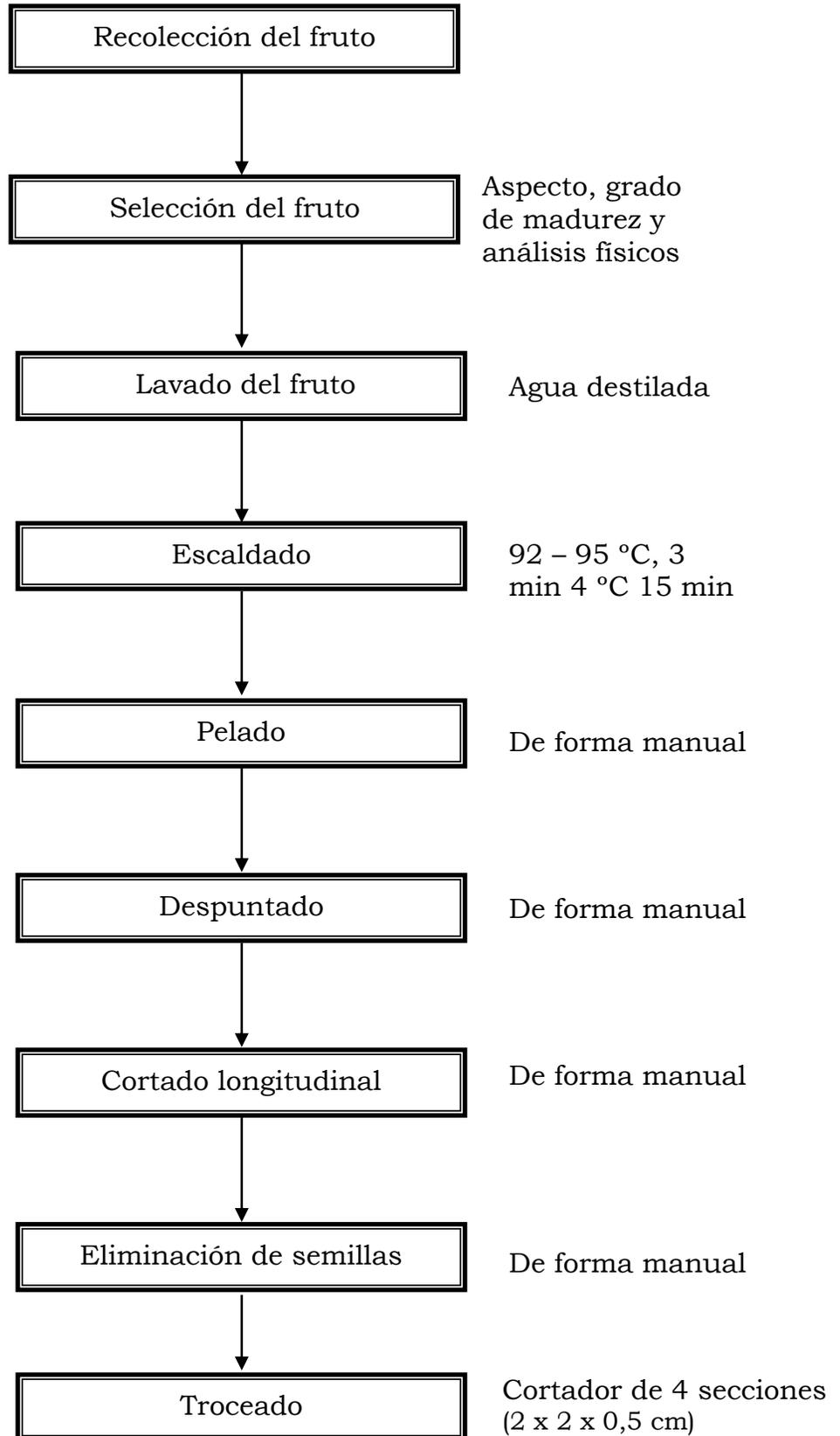
**(b)**

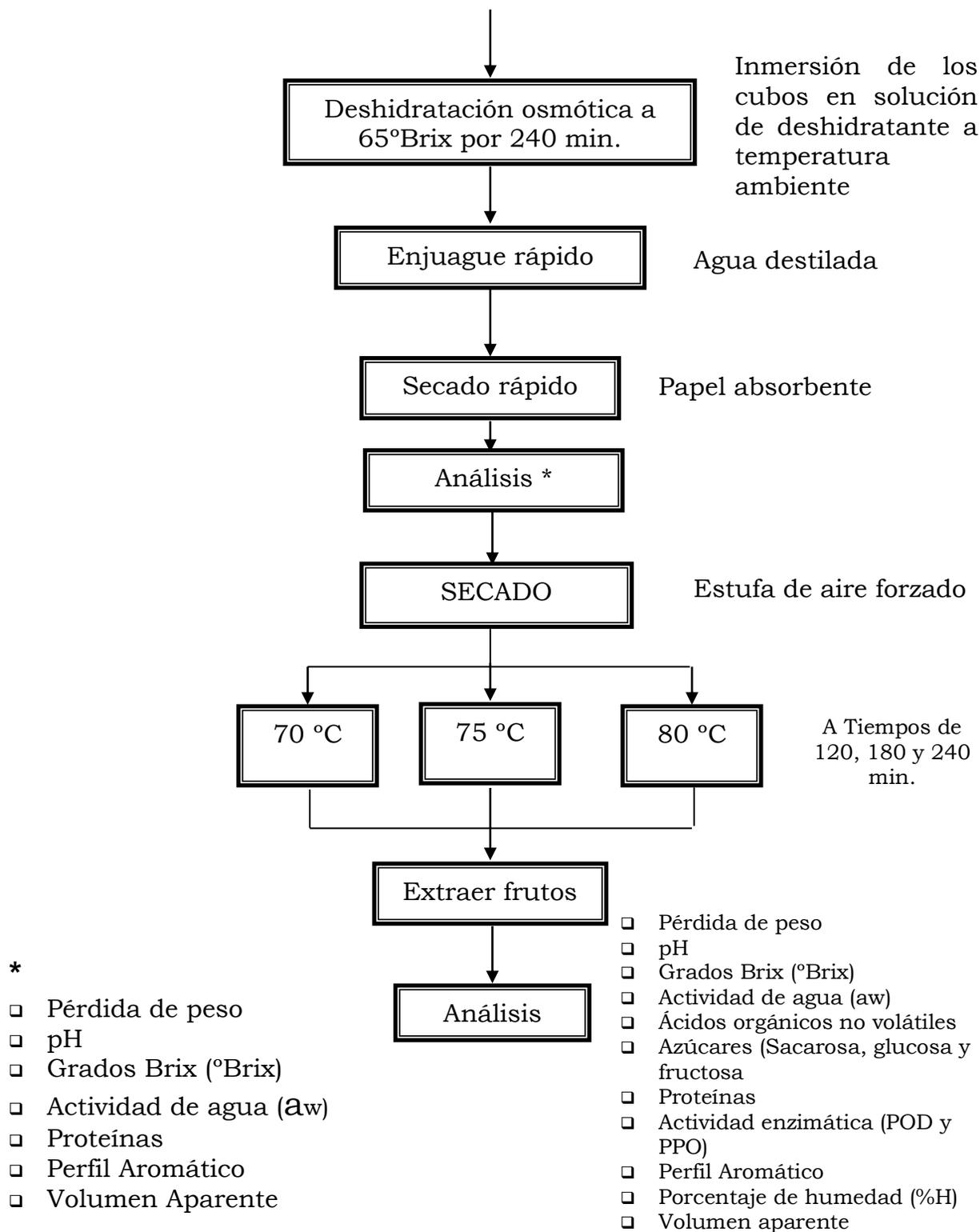


**(c)**



**(d)**





(e)

Figura 7: (a), (b) Método de corte y obtención de cubos deformados de tomate de árbol para DO-AC, (c) montaje de la DO, (d) equipo para realizar secado por aire caliente, (e) Diagrama de flujo, DO-AC

### **5.3. SOLUCIÓN OSMÓTICA**

Se empleó como solución osmótica una disolución de sacarosa preparada con agua destilada y sacarosa, a 65 °Brix, agitando la mezcla continuamente y calentándola, sin superar la temperatura de 40 °C para evitar la caramelización del azúcar; posteriormente se adicionó, 1.0 g/L ácido cítrico y 0.5 g/L ácido ascórbico como conservante y antioxidante respectivamente. La relación fruta jarabe fue de 1:20.

### **5.4. CINÉTICA DE SECADO**

Los cubos deformados de tomate de árbol fresco fueron sometidos a análisis fisicoquímicos de: peso, humedad, densidad aparente, pH, actividad enzimática POD y PPO y la actividad del agua ( $a_w$ ), después se sumergieron en el fluido osmótico de 65 °Brix a 240 minutos y a presión atmosférica (DO). Luego de retirarlos del fluido osmótico se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos de: peso, humedad, densidad aparente, pH, actividad enzimática POD y PPO y la actividad del agua ( $a_w$ ). La experimentación se realizó a temperatura ambiente (22 – 27 °C) y a una humedad relativa promedio de 75%; después se procedió a secar en una estufa de aire forzado utilizando temperaturas de 70, 75 y 80 °C a tiempos de secado de 120, 180 y 240 minutos.

### **5.5. PESO**

Se pesaron cada uno de los cubos deformados escaldados en una balanza analítica marca Precisa Modelo 40SM – 200 A, con sensibilidad  $\pm 0.00001$  antes, después de la deshidratación osmótica y al finalizar el secado, figura 8.

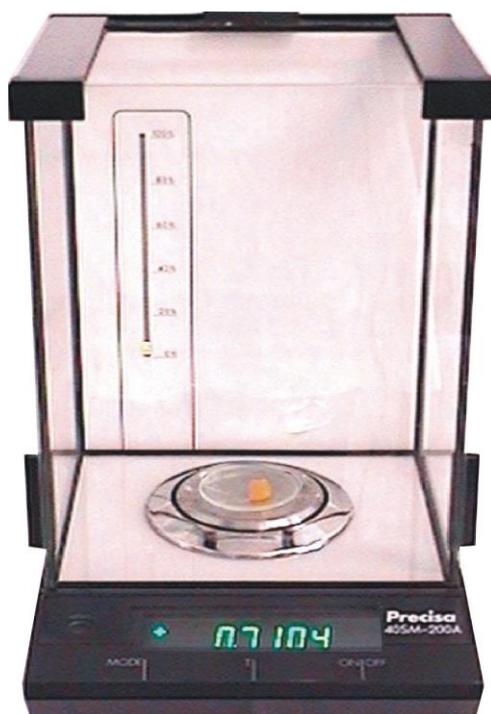


Figura 8: Balanza analítica marca Precisa Modelo 40SM – 200 A

### **5.6. HUMEDAD**

La determinación de la humedad se llevó a cabo en una balanza marca PRECISA 310M SWISS Quality Precisa Ha 300 de infrarrojo, figura 9. Se

hicieron ensayos para estandarizar la temperatura y el tiempo de secado. Se estableció la temperatura de secado a 85 °C y un tiempo entre 70 – 80 min. El equipo registra de forma automática la variación del peso de la muestra que se va convirtiendo en valores de humedad (g agua /100 g muestra) considerando que todo el peso perdido corresponde a agua evaporada. Cuando el valor de la humedad aparece constante, ese valor corresponderá a la cantidad de agua pérdida por la muestra.



Figura 9: Balanza marca PRECISA 310M SWISS Quality Precisa Ha 300 de infrarrojo.

### **5.7. DENSIDAD APARENTE**

Para esta determinación se empleó un picnómetro cilíndrico utilizando agua destilada como líquido de referencia. Este método está basado en

el desplazamiento del volumen de líquido al introducir la muestra en el picnómetro, figura 10. (Moraga, 2002)

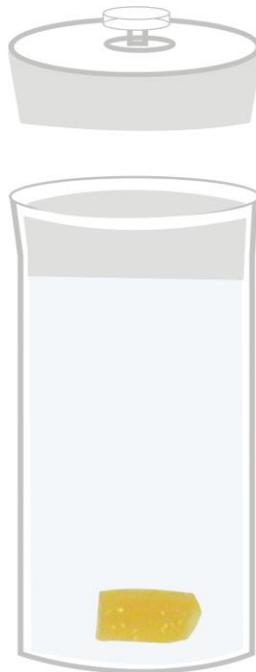


Figura 10: Picnómetro cilíndrico

Los valores de la densidad aparente ( $\text{kg/m}^3$ ) fueron obtenidos a partir de la ecuación (4):

$$\rho_a = \frac{P_1}{P_2 + P_1 - P_3} * \rho_{H_2O}$$

(4)

Donde:

$P_1$ = peso del trozo de fruta (g).

$P_2$ = peso del picnómetro enrasado con agua destilada (g).

$P_3$ = peso del picnómetro enrasado con el agua y con la fruta (g).

$\rho_{H_2O} = 1000 \text{ kg/m}^3$ .

### **5.8. POTENCIAL DE HIDROGENO (pH)**

La medición se realizó con un pHmetro con un electrodo de penetración (figura 11) para realizar una punción directa sobre los cubos antes, después de la deshidratación y al finalizar el secado, al igual que al fluido osmótico. (AOAC, 1997)

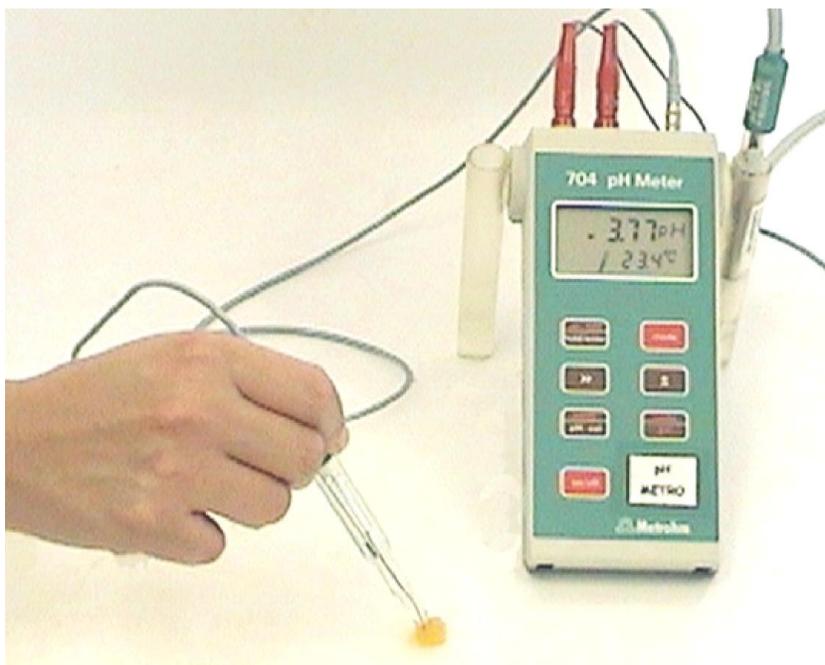


Figura 11: pHmetro con un electrodo de penetración.

### **5.9. SÓLIDOS SOLUBLES (°Brix)**

Los sólidos solubles (°Brix) se midieron con un refractómetro METTLER TOLEDO Refracto 30P, escala de 0 a 85 °Brix, figura 12. La muestra de tomate de árbol para leer, se obtuvo por maceración de los cubos deformados colocando una parte de la muestra sobre el prisma del

refractómetro este método fue usado en fresco, deshidratado osmóticamente y al secado, el equipo registra la temperatura de la misma. Para la toma de °Brix a la muestra seca se homogenizó previamente en el homogenizador marca Hirosagua Airon Works a 18000 rpm a la cual se le agregó una cantidad de agua destilada para luego efectuarse los cálculos según la siguiente ecuación 5 (Rausell, O. et. al, 2001):

$$X_{SS} = \frac{Brix(mH_2O + m_0 X_w)}{(100 - Brix)m_0}$$

(5)

Donde

$mH_2O$  = Gramos de agua añadida (g)

$m_0$  = Masa inicial de la muestra (g)

$X_w$  = Humedad de la muestra (g agua/g muestra)



Figura 12: Refractómetro METTLER TOLEDO Refracto 30P, escala de 0 a 85 °Brix.

### **5.10. ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ )**

Para llevar a cabo la medición de la actividad de agua se coloca el porta muestras con la muestra de tomate de árbol en la cámara de equilibrado, se cierra y se pulsa el botón de lectura, cuando se alcanza el equilibrio se obtiene la lectura de la actividad de agua y la temperatura de la misma. Previamente, se realiza la calibración del equipo DECAGON Pa<sub>w</sub> Kit Water Activity Meter (figura 13) con soluciones saturadas de sales de actividad del agua conocidas: NaCl 6 m  $a_w = 0.760$  y LiCl 13.41 m  $a_w = 0.250$ .



Figura 13: DECAGON Pa<sub>w</sub> Kit Water Activity Meter

### **5.11. ACIDOS ORGÁNICOS NO VOLÁTILES**

Para la determinación del contenido de ácidos en cubos deformados de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav) sendtn) deshidratado por métodos combinados para cada temperatura y tiempo de tratamiento respectivo se toman 10 g de muestra y se adiciona 60 mL de agua para posteriormente llevarla a centrifugar a 4400 rpm por 20 minutos a 4 °C, de lo cual se toma 1 mL del sobrenadante, se afora a 10 mL con agua grado 1 y se pasa por filtro Millipore 0.45  $\mu$  para finalmente ponerlos en viales y eluir por HPLC con un detector UV. Se utilizó curva patrón de ácido cítrico. (Pinzón, 2000)

### **5.12. AZÚCARES**

Para la identificación de azúcares: glucosa, fructuosa y sacarosa se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Las muestras deshidratadas por métodos combinados DO-AC se prepararon homogenizando 10 gramos de muestra y posterior afora a 25 mL, con agua grado 1; esta disolución fue transvasada a tubos ependorff para centrifugación a 12000 rpm, durante 15 minutos a 0 °C, el líquido sobrenadante fue filtrado a través de una membrana millipore de 0.45  $\mu$ m, el filtrado fue conservado en viales de 1.9 mL a -18°C hasta su lectura; los análisis se realizaron por triplicado. (Pinzón, 2000)

Las condiciones de elución cromatográfica fueron:

Equipo HPLC marca HP 1047 A para azúcares y HP 1050 para ácidos.

Bomba: 515 Waters

Columna: BIORAD HPX 87-H 9  $\mu\text{m}$  300 mm x 7.8 mm

Flujo: 0.9 mL/min.

Temperatura de la columna: 30 °C

Fase Móvil: Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.005 M

Detector: IR y UV

Tiempo de elución: 12 minutos

Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$

Autosampler 717 de WATERS



Figura 14: Cromatografo líquido de alta eficiencia (HPLC)

### **5.13. CONTENIDO DE PROTEÍNAS**

Se ha utilizado uno de los métodos más sencillos “Ensayo de fijación de colorante”, planteado por Bradford. Como su nombre lo implica, un colorante que se añade a una solución de proteína se une a la proteína disponible, produciendo un complejo colorante - proteína. El colorante utilizado es el azul brillante de Coomassie, de naturaleza ácida. Éste colorante cuando se encuentra libre en solución presenta un máximo de absorbancia de 465 nm. Cuando se enlaza a la proteína el máximo de absorbancia cambia a 595 nm. Así, la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína.

La concentración de proteínas de las muestras se determina por comparación de la absorbancia de las muestras con una curva estándar.

El contenido de proteína se analizó en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS) con arreglo de diodos Hewlett Packard 8453, (figura 14), según metodología de Bradford. Para la obtención del extracto, 10 g de muestra tanto fresca como deshidratada y óptima del secado; homogenizando con 50 mL de NaCl 0.15 M, para posteriormente centrifugar y con el sobrenadante hacer las medidas correspondientes unida al azul brillante de Coomassie expresado anteriormente con más detenimiento. (Bradford, 1996)

#### **5.14. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PPO Y POD**

La actividad enzimática PPO y POD se analizó en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS) con arreglo de diodos Hewlett Packard 8453, (figura 14a), según metodología establecida por Pinzón (2000). Para la obtención del extracto, 10 g de muestra tanto fresca como seca en todos los tiempos, y temperaturas de trabajo, se adicionaron a 25 mL de tampón fosfato 0.2 M a pH 6.5, 1 g de polivinilpirrolidona (PVP) y 250  $\mu$ L de tritón. La mezcla se homogenizó sobre baño de hielo en un homogenizador marca Hirosagua Airon Works a 18000 rpm (figura 14b) durante 6 min (30 segundos homogenizando y 30 segundos en reposo), el homogenizado se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4°C, el sobrenadante se mantuvo en refrigeración hasta análisis de actividad PPO y POD. (Pinzón, 2000)

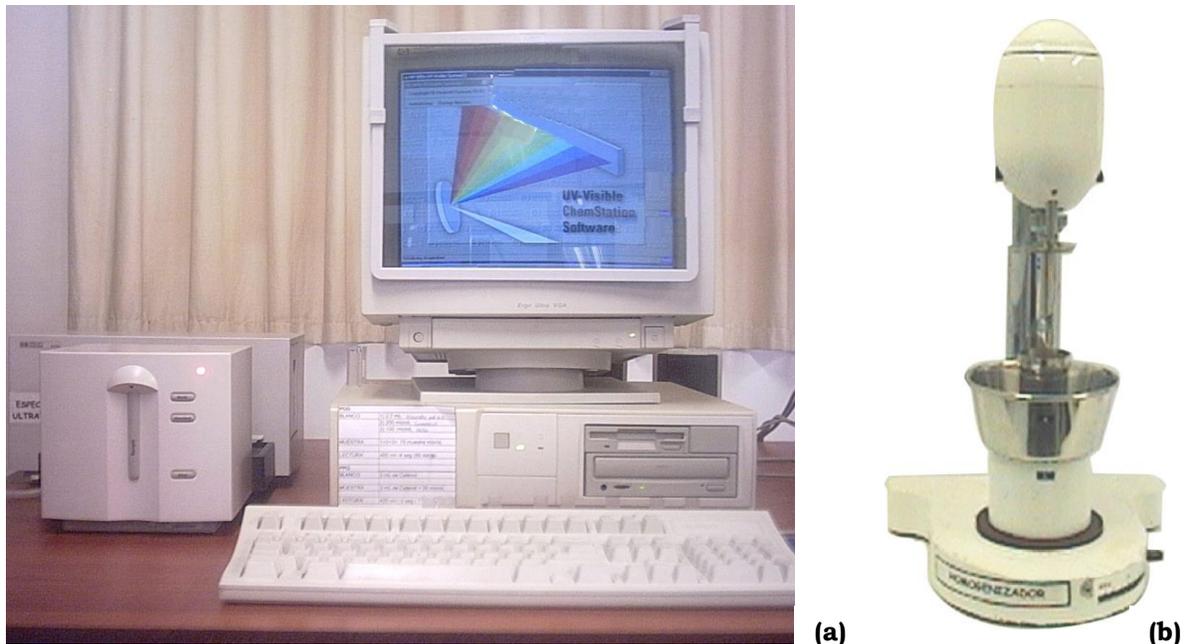


Figura 14: (a) Espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS) con arreglo de diodos Hewlett Packard 8453, (b) Homogenizador marca Hirosagua Airon Works a 18000 rpm

#### **5.14.1. ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)**

En una celda desechable, se prepara un blanco que contiene 2.7 mL de tampón fosfato 0.2 M a pH 6.5, 0.2 mL de guayacol al 1% y 0.1 mL de peróxido de hidrógeno al 1.5 %, se agita la muestra y se lee en un espectrofotómetro UV-VIS, a una longitud de onda de 485 nm. Para la lectura de la muestra, se agregan 0.075 mL del extracto al blanco, se agita y se lee la absorbancia cada 4 segundos por 6 minutos. La temperatura de lectura fue de 25 °C. (Pinzón, 2000)

#### **5.14.2. ACTIVIDAD POLIFENOLOXIDASA (PPO)**

En una celda desechable, se prepara un blanco que contiene 3.0 mL de catecol 0.07 M en tampón fosfato pH 6.5, se lee en un espectrofotómetro UV-VIS, a una longitud de onda de 420 nm. Para la muestra se agregan 0.035 mL del extracto se agita y se lee la absorbancia cada 5 segundos por 6 minutos. La temperatura de lectura es de 24 °C. (Pinzón, 2000)

### **5.15. PERFIL AROMÁTICO**

#### **5.15.1. AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL**

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se introducen 300 g de muestra triturada y 100 mL de agua. El matraz se lleva a un baño de ultrasonidos durante 5 min. para favorecer la total disgregación de la muestra en una manta de calentamiento uniforme en el cual se va a introducir el matraz de fondo redondo, se calienta a 110 °C. El baño de

agua en el que se introducen el matraz corazón con 10 mL de éter etílico se calienta a 40 °C.

Los baños deben estar calientes a dichas temperaturas antes de introducir los matraces correspondientes. Es conveniente no acoplar al equipo el matraz corazón hasta que el contenido del matraz de fondo redondo no comience a hervir (figura 15). (Mora R, 2001)



Figura 15: montaje DES para separación de la fracción volátil de tomate de árbol fresco, DO y DO-AC

### **5.15.2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCIÓN VOLATIL**

El destilado concentrado se inyecta inmediatamente a un cromatógrafo de gases un volumen de 1 $\mu$ L.

Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

- Volumen de inyección 1 $\mu$ L.
- Relación de split 1/16
- Gas portador, nitrógeno a 20 psi
- Temperatura inyector 220 °C
- Temperatura detector 220 °C
- Temperatura del horno:
  - Temp. 1 = 45 °C durante 10 min.
  - Temp. 2 = 171 °C durante 34 min.
  - Temp. 3 = 220 °C durante 10 min.
- Rampas :
  - Rampa 1 = 3 °C/min.
  - Rampa 2 = 10 °C/min.

Los componentes volátiles son identificados comparando los tiempos de retención con los de sustancias patrones pinchadas en idénticas condiciones. (Mora R., 2001)



Figura 16: Cromatógrafo de gases utilizado para la determinación de los componentes volátiles de tomate de árbol fresco, DO y DO-AC.

### **5.16. ANÁLISIS SENSORIAL**

Se conforma un panel de catadores quienes con sus observaciones completan el cuestionario diseñado para caracterizar los trozos de tomate de árbol (DO-AC).

El test consta de cinco parámetros que son calificados unos con tres y otros con dos ítems; a continuación se muestra un ejemplo de la encuesta realizada:

### 5.16.1. TEST DE PRUEBAS SENSORIALES

<b>1. Ausencia de defectos:</b>
Grado de ausencia de material extraño inofensivo como pedazos de pepa, cáscara, manchas superficiales marrón claro u oscuro, trozos chatos, partidos, o cualquier otro defecto que afecta la apariencia del producto.
<b>a)</b> Libre de defectos
<b>b)</b> Material no característico, trozos chatos, cortados, manchados, etc.
<b>2. Color:</b>
Se refiere al color de la superficie exterior el cual debe ser uniforme y libre de color carmelito.
<b>a)</b> Unidades de color naranja brillante
<b>b)</b> Unidades de color naranja pálido-amarillo
<b>c)</b> Predomina el color amarillento u otros colores no característicos
<b>3. Uniformidad de tamaño y simetría:</b>
<b>a)</b> Unidades de tamaño uniforme y forma simétrica
<b>b)</b> Unidades de diferente tamaño y forma irregular

<b>4. Sabor:</b>
<b>a)</b> Característico, dulce, ligeramente ácido
<b>b)</b> Muy ácido, muy dulce, astringente
<b>c)</b> No característico, amargo, fermentado
<b>5. Carácter:</b>
Se refiere al grado de madurez, a la textura y condición de la carne, a la firmeza y ternura del tomate.
<b>a)</b> Tomates flexibles, tiernos y carnosos; poseen ejes bien definidos
<b>b)</b> Ternura variable dentro del mismo tomate. Tendencia a aplanarse, ejes ligeramente desmembrados.
<b>c)</b> Ternura y carnosidad variable entre los tomates; ejes deshilachados, masa muy dura

Tabla 1: Test de pruebas sensoriales

Leach and Mason (1964), Lees and Jackson (1975), Muñoz (1977)

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los datos obtenidos son analizados en el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

Se emplea un diseño factorial con tres factores 3 X 3 cuyo modelo estadístico se representa en la ecuación (6):

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \xi_{ijk}$$

$$i = 1, 2, 3$$

$$j = 1, 2, 3$$

$$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$$

$Y_{ijk}$  = Observación  $ijk$  de la variable de respuesta.

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del tiempo

$\beta_j$  = Efecto de la temperatura

$(\tau\beta)_{ij}$  = Interacción entre la concentración y los tiempo.

$\xi_{ijk}$  = Efecto de error aleatorio.

El P-valor o nivel de significación empírico del contraste es el dato obtenido a partir del valor del estadístico del contraste, nos informa sobre cuál sería el nivel de significación más pequeño que nos hubiera permitido rechazar la hipótesis nula.

## 7. HIPÓTESIS

$$H_0: \tau_i = 0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0$$

$$H_0: \beta_j = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0$$

$$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0$$

$$H_1: (\tau\beta)_{ij} \neq 0$$