

**Efectos de pretratamientos en la actividad de
polifenol oxidasa extraída de manzana
(*Malus domestica*)**

**Alex Santiago Villacrés Brazales
Diego Eduardo Casas Murillo**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efectos de pretratamientos en la actividad de
polifenol oxidasa extraída de manzana
(*Malus domestica*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
por el título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Alex Santiago Villacrés Brazales
Diego Eduardo Casas Murillo**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2015

Efectos de pretratamientos en la actividad de polifenol oxidasa extraída de manzana (*Malus domestica*)

Presentado por:

Alex Santiago Villacrés Brazales
Diego Eduardo Casas Murillo

Aprobado:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Juan Ruano, D.Sc.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efectos de pretratamientos en la actividad de polifenol oxidasa extraída de manzana (*Malus domestica*)

**Alex Santiago Villacrés Brazales
Diego Eduardo Casas Murillo**

Resumen: El pardeamiento enzimático es un deterioro químico que provoca grandes pérdidas en productos de origen hortofrutícola durante su almacenamiento. Un pequeño equipo generador de campos eléctricos pulsantes (CEP) por lotes con capacidad de 450 mL fue diseñado y desarrollado (Fase I). Polifenol oxidasa (PFO) extraída de manzana (red delicious) fue tratada con diez combinaciones de cargas y tiempos entre 15.6-33.6 kV/cm y 110-448 ms, con una frecuencia de pulso de 12.5 kHz y ancho de onda de 0.04 ms, con ondas cuadradas monopares positivas y se analizó bajo la metodología de superficie de respuestas (Fase II). El tratamiento eléctrico con menor actividad residual de PFO fue comparado contra un tratamiento térmico (70 °C × 1 min.), uno químico (5 mg/L de Ácido Ascórbico) y un control (Fase III). La actividad residual de PFO se redujo hasta un 68% al aplicar un CEP de 24.6 kV/cm×250 ms siendo este el mejor tratamiento. La actividad residual de PFO incrementó hasta 15% con un tratamiento de 18.2 kV/cm×110 ms. En la Fase III, el tratamiento químico resultó en una actividad residual de PFO de 41%, seguido por el térmico en el cual la actividad residual fue de 48% y por último el tratamiento de CEP donde la actividad residual fue de 64%. El equipo diseñado fue eficaz en la inhibición de PFO y al ser comparado contra otros tratamientos tradicionales no resultó ser el mejor. Se recomienda cambiar la especificación de la polaridad de onda del equipo de campos eléctricos pulsantes para una mayor inactivación enzimática.

Palabras clave: Campos eléctricos pulsantes, inactivación enzimática, procesamiento no térmico.

Abstract: Enzymatic browning is a chemical spoilage responsible for many losses in fruit and vegetables during their storage. A laboratory scale pulsed electric field machine with the capacity of 450 mL was designed and built (Phase I). Poliphenol oxidase (PPO) extracted from apple (red delicious) was treated with ten different combinations of electric field strengths and times, ranging from 15.6-33.6 kV/cm and 110-448 ms respectively and analyzed by a surface response experimental design. The pulse frequency was set at 12.5 kHz and pulse width at 0.04 ms applied in a positive monopolar square waveform pulse (Phase II). The best electric treatment was compared to a thermal (70 °C × 1 min.), chemical (5 mg/L ascorbic acid) treatment and a control (Phase III). The PPO activity was reduced up to 68% of residual activity when applying field strengths of 24.6 kV/cm×250 ms. The activity of PPO was increased up to 15% when treated at 18.2 kV/cm×110 ms. In Phase III the chemical treatment had a residual activity of PPO of about 41% followed by the thermal treatment with a residual activity of 48%, and last, the electric treatment where the residual activity was 64%. The designed machine was effective in the inhibition of PPO and when

compared to traditional industrial treatments it was not the better. It is recommended to change the specifications of the polarity of the wave of the pulsed electric field to a bipolar wave to achieve best enzymatic inhibition.

Keywords: Enzymatic inactivation, no thermal process, pulsed electric fields

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES.....	24
5. RECOMENDACIONES.....	25
6. LITERATURA CITADA	26
7. ANEXOS.....	30

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción del arreglo de los tratamientos en la Fase II dado por la metodología de superficie de respuestas	7
2. Niveles de las variables independientes para la generación del campo eléctrico pulsante.....	8
3. Delineamiento del diseño experimental completo.	9
4. Promedios y desviaciones estándares (DE) del proceso de validación de máquina generadora de campos eléctricos pulsantes.	15
5. Promedios y desviaciones estándares (DE) del efecto de las variables independientes sobre la actividad residual enzimática en extracto de polifenol oxidasa de manzana.	17
6. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R^2 para la actividad residual de polifenol oxidasa en función de la carga (X_1) y el tiempo (X_2) utilizados para generar el campo eléctrico.....	17
7. Promedios y desviaciones estándares (DE) del efecto de los pretratamientos poscosecha aplicados a extracto de polifenol oxidasa de manzana.....	22
Figuras	Página
1. Lineweaver-Burk plot.....	6
2. Diagrama de circuito generador del pulso de campo eléctrico pulsante.	12
3. Efecto la Carga (kV/cm) y Tiempo (ms), en la actividad residual de polifenol oxidasa extraída de manzana.	19
4. Curva de Michaelis-Menten del mejor tratamiento de campos eléctricos pulsantes y el control en extracto de polifenol oxidasa de manzana.	20
5. Curva de Michaelis-Menten para el efecto de pretratamientos en la velocidad de reacción de polifenol oxidasa de manzana.	21
Anexos	Página
1. Esquema del circuito utilizado en la generación del campo eléctrico pulsante.	30
2. Documento extendido por la entidad certificadora de equipo generador de CEP..	31

1. INTRODUCCIÓN

La manzana (*Malus domestica*) es una fruta estacionaria perteneciente a la familia de las Rosaceae. Su clima óptimo de crecimiento es en zonas con temperaturas debajo de 7 °C, generalmente arriba de 2000 msnm (Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola, 1991). La manzana puede desarrollarse a 1000 msnm donde la temperatura está por debajo de 21 °C (FHIA, 2006). Es de cáscara delgada, rica en fibra, además contiene un mesocarpio comestible rico en gomas y pectinas. Su color es diferente dependiendo de la variedad con colores entre rojo, amarillo y verde.

En general, los productos de proveniencia hortofrutícola presentan pérdidas poscosecha de hasta 50% en los países en vías de desarrollo (Kader y Kitinoja, 2003). Al momento de almacenar la manzana se controlan diversos factores tanto del ambiente como de la materia prima, los cuales son: actividad de agua, pH, temperatura, humedad relativa y cantidad de luz. Todos se controlan con el fin de mantener las características organolépticas de la manzana fresca (Alzamora *et al.*, 2004). El deterioro que se presenta en almacenamiento puede ser de tipo microbiológico o químico (Barreiro y Sandoval, 2006). Una parte considerable de este deterioro en el manejo de la manzana en almacenamiento es el químico, específicamente el pardeamiento enzimático.

El pardeamiento enzimático se debe principalmente a una enzima llamada polifenol oxidasa (PFO). Esta enzima reacciona con monofenoles o difenoles presentes naturalmente en la manzana. La enzima cataliza una serie de reacciones que comienzan con la transformación de un monofenol a un difenol, seguido por la transformación de éste en una quinona (Aka *et al.*, 2013). A partir de la formación de la quinona se forman trifenoles y posteriormente se oxidan a hidroxiquinonas. Todas estas sustancias son muy reactivas y crean polímeros reaccionando con sustancias que estén presentes en el alimento, generalmente proteínas (Guerrero, 2009). El producto final se conoce como melanoidinas que son las que crean el color pardo, lo que hace a la manzana y otras frutas y vegetales indeseables al consumidor, aun cuando éstos se procesan (Vela, 2004).

El tratamiento de campos eléctricos pulsantes (CEP) es considerado un tratamiento no térmico debido al ligero incremento de temperatura que tiene el producto expuesto al mismo. (Robles *et al.*, 2012). En este proceso se aplican pulsos eléctricos muy cortos de alto poder o voltaje por cortos periodos de tiempo (Toepfl *et al.*, 2005; Fincan y Dejmek, 2002). En el tratamiento con CEP existen diferentes parámetros que deben ser tomados en

cuenta para que este sea efectivo. Estos parámetros son las condiciones del proceso como intensidad de campo, ancho del pulso, frecuencia del pulso y tiempo de tratamiento, así como las condiciones del producto las cuales son tiempo de retención, temperatura y movimiento del producto; y las propiedades de la sustancia como pH, conductividad, composición (Cerón *et al.*, 2010).

El tratamiento de campos eléctricos pulsantes (CEP) es efectivo en la reducción de la actividad de PFO y otras enzimas en frutas como la pera. Recientemente se han evaluado tratamientos de CEP con una fuerza de campo de 24.6 kV/cm y 31 kV/cm por tiempos entre 1-6 ms, reduciendo la actividad de esta enzima (Giner *et al.*, 2001).

La aplicación de CEP puede constituir una alternativa para los tratamientos tradicionales como el térmico y la adición de compuestos orgánicos a los productos (Barba *et al.*, 2015). Esta tecnología tiene ciertas ventajas como el cambio mínimo en las propiedades sensoriales, nutricionales y saludables del producto tratado que generalmente es un líquido (Belloso *et al.*, 2014). Por esto se diseñó un equipo de campos eléctricos pulsantes con tratamiento por tandas, de onda cuadrada monopolar, con capacidad de hasta 450 mL de extracto de PFO con variantes de intensidad de campo, ancho del pulso, frecuencia del pulso y tiempo total de tratamiento, para el tratamiento de extracto de PFO de manzana.

El propósito de este estudio fue comparar el efecto de la aplicación de campos eléctricos pulsantes en extracto de PFO contra los pretratamientos de escaldado y la adición de antioxidantes utilizados en la industria. Los objetivos establecidos en este estudio fueron:

- Fabricar y validar un equipo generador de campos eléctricos pulsantes.
- Encontrar la mejor combinación de intensidad de campo (kV/cm) y tiempo (ms) con mayor efecto en la inhibición de PFO.
- Evaluar el efecto de tres pretratamientos en la reducción de la actividad de PFO.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. La primera fase del estudio se realizó en el laboratorio de Electrónica del Técnico Honduras en Tegucigalpa. La segunda y tercera fase se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos del Departamento de Agroindustria Alimentaria en la Escuela Agrícola Panamericana.

Fase I: Fabricación del equipo generador de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP).

Diseño de la cámara de campos eléctricos pulsantes (CEP). Se diseñó una cámara cilíndrica para la aplicación de campos eléctricos pulsantes, donde el cátodo es un cilindro de acero inoxidable de grado alimenticio, con una altura de 34 cm y un diámetro externo de 3.8 cm el cual se encuentra relleno de teflón para brindar rigidez y aislamiento a corrientes eléctricas en su interior. Este cátodo está insertado dentro del ánodo, que es un cilindro de acero inoxidable de igual altura, con un diámetro interno de 5.6 cm y uno externo de 5.71 cm. El producto a ser tratado es colocado en la separación entre los dos cilindros. Ambos conforman la cámara del equipo, la cual en las orillas está aislada con teflón para evitar que el potencial eléctrico salga de la cámara. Por las puntas de cada cilindro sale un cable conductor para poder instalar el sistema de creación del choque eléctrico. Toda la cámara se encuentra montada sobre un pedestal para su conveniencia de manejo.

Creación de campo eléctrico. El campo eléctrico creado es un campo eléctrico uniforme a través de toda la cámara de tratamiento, es decir, es constante en toda la cámara. Esto se debe a que el ánodo y cátodo se encuentran alineados equidistantemente entre sí a lo largo de toda la cámara. Para crear un campo eléctrico constante se debe colocar dos placas con cargas opuestas, una en contra de la otra y paralelas entre sí. La dirección del campo siempre se da de la placa positiva hacia la placa negativa. El potencial eléctrico (V) se define como el trabajo necesario para que una unidad de carga pase de un punto de referencia a otro dentro de un campo eléctrico, este se mide en voltios con la ecuación 1.

$$V = \frac{\Delta E}{Q} \quad [1]$$

Donde V es el potencial eléctrico, ΔE es el trabajo necesario para mover la carga y Q es la carga. El potencial eléctrico cambia de manera uniforme en un campo eléctrico uniforme y

está directamente relacionado con la distancia desde el punto de referencia, en este caso el ánodo. La intensidad de un campo eléctrico uniforme se mide con la ecuación 2.

$$E = \frac{F}{Q} \quad [2]$$

Donde E es la intensidad del campo eléctrico y está dado por la Fuerza (F) dividida entre la carga (Q). Sabemos que ΔE es el trabajo necesario para mover una carga, con la ecuación 3 del trabajo podemos saber E.

$$\Delta E = Fd \quad [3]$$

Despejando la fórmula para la fuerza podemos saber que la fuerza es la energía dividida entre la distancia. Recordando la ecuación uno podemos decir que la carga (Q) es igual al cambio de energía o trabajo (ΔE) dividido por el potencial eléctrico (V) como se ve en la ecuación 4.

$$Q = \frac{\Delta E}{V} \quad [4]$$

Ahora, si sustituimos los valores de fuerza y carga en la ecuación dos se puede calcular la intensidad del campo como se observa en la ecuación 5.

$$E = \frac{V}{d} \quad [5]$$

Donde V es el potencial eléctrico medido en voltios y d es la distancia entre el ánodo y el cátodo en metros. Así se hizo el cálculo del potencial eléctrico necesario para alcanzar el campo eléctricos de 36.7 kV/cm sabiendo que la distancia entre las dos placas es de aproximadamente 18 mm.

Validación del equipo de CEP. En el laboratorio de electrónica del Técnico Honduras se validó el voltaje, tipo de onda y tiempo del campo eléctrico. El tipo de onda se evaluó con un osciloscopio que mide el tipo de onda que se aplica, en este caso una onda cuadrada monopolar positiva. La tensión se evaluó con una sonda de alta tensión de pico máximo, haciendo 100 disparos en rango bajo, medio y alto de la máquina.

Fase II: Optimización del tratamiento eléctrico para inactivar PFO extraída de manzana.

Extracción de la enzima. La manzana variedad red delicious fue lavada, pelada y se removieron las semilla para ser procesada en un procesador de alimentos Hamilton Beach® FP20 hasta obtener un puré de manzana. Este fue mezclado con buffer de fosfatos 0.1 M y pH 6.8 en una relación 1:1. La mezcla fue centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos en una centrífuga IEC Modelo K. El sobrenadante fue filtrado en papel cuantitativo de 180 μm y congelado en bolsas ziploc de 450 mL para ser utilizadas en los tratamientos.

Aplicación del tratamiento eléctrico. En la cámara de tratamiento de CEP se colocaron 450 mL del extracto de PFO calentado a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ y uno por uno, se aplicaron los

tratamientos (kV/cm × tiempo) dados por la metodología de superficie de respuestas. Para la aplicación del CEP, se reguló en el panel de control la tensión (kV/cm) y tiempo a aplicar a cada lote de extracto de PFO. Dado que la máquina podía ser regulada solamente hasta 11 ms de tiempo total de tratamiento y la metodología de superficie de respuestas requería de tiempos muy superiores a este, se dividió el tiempo total requerido entre 50, que fue el número de disparos realizados, para que el tiempo de tratamiento estuviese dentro del rango dado por las especificaciones del equipo. Una vez aplicado el tratamiento, el extracto de PFO fue removido de la cámara y se colocaron aproximadamente 8 mL del mismo en un tubo de ensayo. La cámara fue lavada entre tratamientos. La actividad enzimática fue evaluada mediante un análisis espectrofotométrico durante 60 segundos y los datos se reportaron en unidades de absorbancia (nm).

Análisis cinético de datos. Los datos se obtuvieron a partir de un análisis espectrofotométrico en el cual se evaluó el cambio en el espectro de absorción a una longitud de onda de 395 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5. El cambio en absorbancia se midió cada 10 s, durante el tiempo estipulado para cada fase del estudio. Se utilizaron siete concentraciones de sustrato (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 y 2.00 g de catecol /L de buffer de fosfatos), con las cuales se analizó la velocidad de acción de PFO y se calculó V_{max} el cual se reportó en g/L × min.

Se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 6) para evaluar la actividad cinética de PFO. Se graficó en el eje horizontal la concentración de sustrato ([S]) y en el eje vertical la velocidad de reacción de la enzima (V_o). El valor de V_{max} fue determinado por la manipulación de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 6), dicha ecuación fue manipulada algebraicamente y se tomó los recíprocos de ambos lados ([S] y V_o) de la ecuación para elaborar un gráfico de dobles recíprocos o Lineweaver-Burk plot (Berg *et al.*, 2002).

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \quad [6]$$

Lineweaver-Burk plot se graficó $1/[S]$ en el eje horizontal contra $1/V_o$ en el eje vertical (Figura 1), donde [S] es el sustrato, V_o es la velocidad de reacción de la enzima, V_{max} es la velocidad máxima a la cual la enzima puede trabajar y K_M es la concentración de sustrato a la cual la enzima trabaja a la mitad de su V_{max} . La pendiente de esta línea es la relación K_M/V_{max} y el intercepto en el eje vertical es $1/V_{max}$ (Berg *et al.*, 2002).

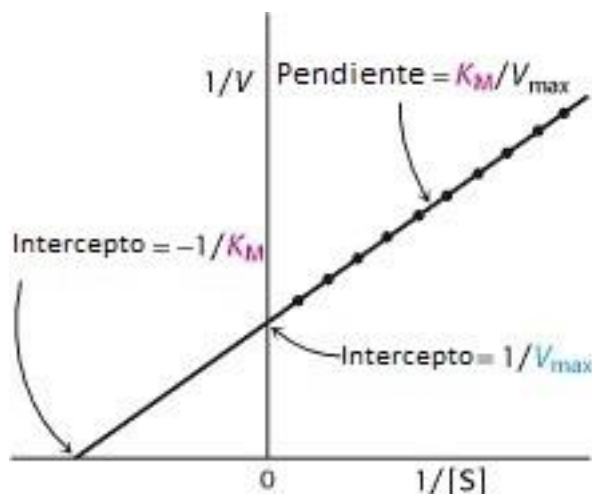


Figura 1. Lineweaver-Burk plot.
Fuente: Berg *et al.*, 2002

Las gráficas de Lineweaver-Burk fueron obtenidas a partir de las tres repeticiones de los datos del análisis espectrofotométrico. La velocidad inicial fue calculada mediante la estimación de la pendiente de la absorbancia para cada concentración de sustrato. El recíproco de la pendiente de la velocidad inicial (V_o) y el recíproco de la concentración de sustrato $[S]$ fueron utilizados para realizar los gráficos.

Por facilidad de entendimiento el V_{max} de cada tratamiento fue reportado como porcentaje residual de actividad enzimática con valores de 0 - 100, donde uno de los controles fue la referencia o el 100% de actividad enzimática y el resto de actividades residuales de PFO se calcularon con la ecuación siete (Bi *et al.*, 2012).

$$AR = \frac{A_t}{A_o} \quad [7]$$

Donde:

AR = Actividad residual enzimática de PFO (0-100)

A_t = Actividad enzimática (V_{max}) una vez aplicado el tratamiento de CEP

A_o = Actividad enzimática (V_{max}) del control

Diseño experimental. Para la segunda fase del estudio los tratamientos se establecieron en un arreglo factorial completo 2^2 estadísticamente delineado en la metodología de superficie de respuesta con un diseño de composición central rotacional de segundo orden (DCCR), con el cual se obtuvo la combinación de las variables independientes, la carga (kV/cm) y el tiempo (ms) óptimos para la generación del CEP. Los parámetros del proceso fueron codificados (-1, 0,+1), esto de acuerdo a la ecuación ocho.

$$xi = Xi - \frac{Z}{\Delta xi} \quad [8]$$

Dónde:

- xi = Valor codificado de la variable Xi
- Xi = Valor real de la variable
- Z = Valor real de la variable en el punto central
- Δxi = Valor del intervalo de variación de xi

Para lograr un entorno experimental con un mayor acote, se delinearon las variables axiales $-\alpha$ y $+\alpha$. Este valor depende del número factorial ($F = 2^k$), donde k es el número de variables independientes ($k=2$). Las variables fueron definidas por la ecuación nueve.

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^k)^{1/4} = 1.414 \quad [9]$$

El total de unidades experimentales de la primera fase para esta metodología es un diseño factorial completo definido por la ecuación 10.

$$n = 2^k + 2k + m \quad [10]$$

Dónde:

- 2^k = número de puntos factoriales
- $2k$ = número de puntos axiales
- m = número de réplicas del punto central

Se utilizaron dos variables independientes y tres niveles codificados para un total de 12 unidades experimentales, siendo cuatro factoriales combinación de los niveles -1 y $+1$, cuatro axiales $-\alpha$ y $+\alpha$ y cuatro puntos centrales actuando como una estimación del error experimental y determinando la precisión del modelo matemático (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción del arreglo de los tratamientos en la Fase II dado por la metodología de superficie de respuestas.

Expresión	Tratamientos	Cantidad puntos
$2^k = 2^2$	4	Factoriales
$2k = 2*2$	4	Puntos axiales
M	4	Puntos centrales
	12	Ensayos

Fuente: Box y Draper, 1959 y Box *et al.*, 2005 adaptado por el autor.

El análisis de los resultados experimentales puede ser descrito como el comportamiento de un modelo, en el cual se combinan dos variables independientes con una variable

dependiente. La respuesta a este modelo es una función de los niveles que se combinan (Box *et al.*, 2005), como se muestra en la ecuación 11.

$$Y = F(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad [11]$$

También se realizó un análisis de regresión para ajustar un polinomio de segundo orden con las variables independientes para cada variable respuesta. La expresión general utilizada con el objetivo de predecir el comportamiento de la respuesta se describe en la ecuación 12.

$$Y_i = (\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon) \quad [12]$$

Dónde:

Y_i	=	Función respuesta
X_1 y X_2	=	Valores de las variables independientes
β_0	=	Coefficiente relativo con la interpretación del eje
β_2 y β_1	=	Coefficientes lineales estimados por el método de mínimo cuadrados
β_{11} y β_{22}	=	Coefficientes de variables cuadráticas
β_{12}	=	Coefficiente de interacción entre las variables independientes
ε	=	Error experimental

El arreglo del modelo propuesto se evaluó con el método de “regresión por pasos” y el análisis de residuos se clasificó como “falta de ajuste”, la comparación de la proporción de la varianza explicada por el modelo, o sea el R^2 . De esta manera los coeficientes de la ecuación cinco del mejor modelo polinomio, se ajustaron a las respuestas de este diseño experimental para la primera fase de este experimento (Moro, 2013).

Los niveles de las variables independientes se describen en el Cuadro 2 con la combinación de todos los niveles factoriales (1 y -1), axiales (1.414 y -1.414) y puntos centrales (0), estos son referentes a la combinación carga (kV/cm) y tiempo (ms) utilizados para el CEP a generar.

Cuadro 2. Niveles de las variables independientes para la generación del campo eléctrico pulsante.

Variables	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_1 (Carga kV/cm)	15.6	18.2	24.6	31.0	33.6
X_2 (Tiempo ms)	52	110	250	390	448

El delineamiento de la primera fase del experimento comprende la expresión completa de todas las variables independientes codificadas y decodificadas, las cuales fueron utilizadas para obtener los análisis de varianza y coeficientes de regresión, así como para la formación del diagrama de las superficies de respuestas respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Delineamiento del diseño experimental completo.

Tratamiento	Niveles de variables codificadas		Niveles de variables decodificadas	
	X_1	X_2	x_1	x_2
1	-1	-1	18.2	110
2	-1	1	18.2	390
3	1	-1	31.0	110
4	1	1	31.0	390
5	-1.414	0	15.6	250
6	1.414	0	33.6	250
7	0	-1.414	24.6	520
8	0	1.414	24.6	448
9	0	0	24.6	250
10	0	0	24.6	250
11	0	0	24.6	250
12	0	0	24.6	250

X_1 y x_1 = Tensión (kV/cm)

X_2 y x_2 = Tiempo (ms)

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza con una significancia de 10%, el modelo de regresión resulta significativo cuando el valor F calculado de la prueba resulta mayor o igual al F de la tabla de puntos de distribución con lo cual se pudo trazar la superficie (Díaz, 2009).

Los datos se procesaron con el programa Statistica versión 7.0 para Windows para lo cual se usaron los valores reales para graficar la superficie de respuestas y los codificados para elaborar las regresiones que expresen el modelo.

Se realizó una separación de medias DUNCAN y un análisis de varianza con un nivel de significancia de 5%, mediante el uso del programa SAS[®] 9.3 (Statistical Analysis Software) para la variable respuesta (% actividad residual) debido a que el modelo resultó no predictivo.

Fase III: Comparación entre pretratamientos poscosecha.

Desarrollo de la tercera fase. Se trabajó con extracto de PFO de manzana. Para la aplicación del tratamiento térmico se colocaron 50 mL de extracto de PFO en un beaker y

se realizó un escaldado a $70\text{ }^{\circ}\text{C} \times 1\text{ min.}$ en baño maría, rápidamente fue enfriado en hielo a temperatura ambiente. Para la aplicación de tratamiento químico se preparó una solución buffer con 5 mg/L de ácido ascórbico, a partir de esta solución se preparó el sustrato a las siete concentraciones de catecol. Para la aplicación del tratamiento eléctrico se colocaron 450 mL de extracto de PFO en la cámara de tratamiento y se aplicó una tensión de $250\text{ kV/cm} \times 250\text{ ms}$ (mejor resultado de la Fase I).

Una vez aplicados todos los tratamientos, se procedió a evaluar la actividad enzimática mediante un análisis espectrofotométrico durante 90 segundos y los resultados fueron reportados en unidades de absorbancia (nm). Para esta fase del estudio, la extracción de la enzima y el análisis cinético de los datos necesarios para realizar el análisis estadístico, fueron obtenidos como se explicó en la fase II del estudio.

Diseño experimental. Se estableció un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro niveles de pretratamientos al extracto de PFO los cuales fueron CEP óptimo ($24.6\text{ kV/cm} \times 250\text{ ms}$), tratamiento térmico ($70\text{ }^{\circ}\text{C} \times 1\text{ min.}$), químico (5mg/L de Ácido Ascórbico) y el control. Se usaron tres repeticiones obteniendo un total de 12 unidades experimentales.

Análisis estadístico. Se estableció una separación de medias DUNCAN y un análisis de varianza con un nivel de significancia de 5%, mediante el uso del programa SAS[®] 9.3 (Statistical Analysis Software) para el porcentaje residual de actividad enzimática.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I: Fabricación del equipo generador de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP). El circuito que se diseñó tiene una entrada de energía proveniente de la red doméstica con 110-120 V de corriente alterna (CA), a una frecuencia entre 50-60 Hz (Figura 2). Al recibir la energía eléctrica por el transformador 1 (T1) se reduce el potencial eléctrico de 110 a 58 V de CA, la cual entra a los diodos (D1, D2, D3 y D4). Juntos se conocen como diodos de doble onda, los cuales solo permiten el paso de una fase de la CA hacia donde indica la flecha. El diodo, al ser de doble onda, junta la fase negativa con la fase positiva de CA, transformando CA a corriente directa (CD), en este caso a CD positiva. Al cambiarse de CA a CD, existe una ganancia de potencial eléctrico que pasa de 58 V de CA a 70 V de CD. Esto puede llegar a variar dependiendo de la cantidad de corriente que este entrando de la red doméstica, ya que esta oscila entre 110-120 V. Al rectificarse la onda esta pasa a un condensador (C1), este condensador es bipolar, con una parte negativa y otra positiva. Al pasar la onda negativa de los diodos llega al condensador, el cual se carga pero no deja pasar la onda negativa. Una vez que pasa la parte positiva del condensador, este se descarga y pasa una onda positiva en el área donde se encontraría la onda negativa terminando así, en una descarga de CD positiva. Se crea lo que se llama un filtro, que elimina el ruido de 60 Hz, creando un flujo positivo de CD sin ninguna frecuencia o ruido.

Al entrar energía de la red doméstica por el transformador dos (T2) se rectifica de igual manera, con la única diferencia que al salir del T2, entra al estabilizador de tensión (ET1). El ET1 tiene como finalidad recibir un máximo 78 V de tensión permitiendo salir solamente 12 V, sin importar la cantidad de voltaje que reciba. Estos 12 V entran a un chip NTE555 que se encuentra en una configuración monoestable. El chip NTE555 genera un pulso con la totalidad de tiempo de tratamiento y está conectado al sistema de disparo del equipo que es el switch uno (Sw1). El rango de mínimo y máximo de tiempo de tratamiento se crea con una resistencia variante llamada potenciómetro (P2) y su interacción con un condensador (C5), ya que el condensador se descarga y el potenciómetro a través de su resistencia variable determina cuanto tiempo durara la descarga. Este potenciómetro da una resistencia que cambia de manera que, a mayor resistencia, menor será el tiempo de tratamiento y a menor resistencia, mayor el tiempo de tratamiento. El pulso positivo creado por el NTE555 monoestable pasa por una resistencia que luego llega a la base de un transistor NPN (Tr3).

Al pasar por el TR3 el pulso positivo llega a otro transistor que es el transistor dos (Tr2) que eventualmente lleva a un tercer transistor (Tr1). El Tr1 es un transistor especial, llamado transistor Darlington, el cual regula con la ayuda de una resistencia variable (potenciómetro uno, P1) la entrada de tensión a los transformadores Flyback. Como máximo permite la entrada de 70 V a los Flybacks, que terminan en un campo eléctrico con fuerza de 36.7 kV/cm. El potenciómetro no puede estar por si solo debido a que al estar sin un transistor, la resistencia se recalienta perdiendo energía al ambiente. El transistor puede regular una tensión sin generar pérdida de energía, ya que esta no regula a la fuerza, como la resistencia, sino que regula de manera perfecta gracias a que existen una serie de canales, entre más canales estén cerrados, más energía fluye y entre menos canales menos energía fluye. Después del transistor Darlington existe una resistencia destinada solo para reducir la intensidad de la corriente eléctrica R2.

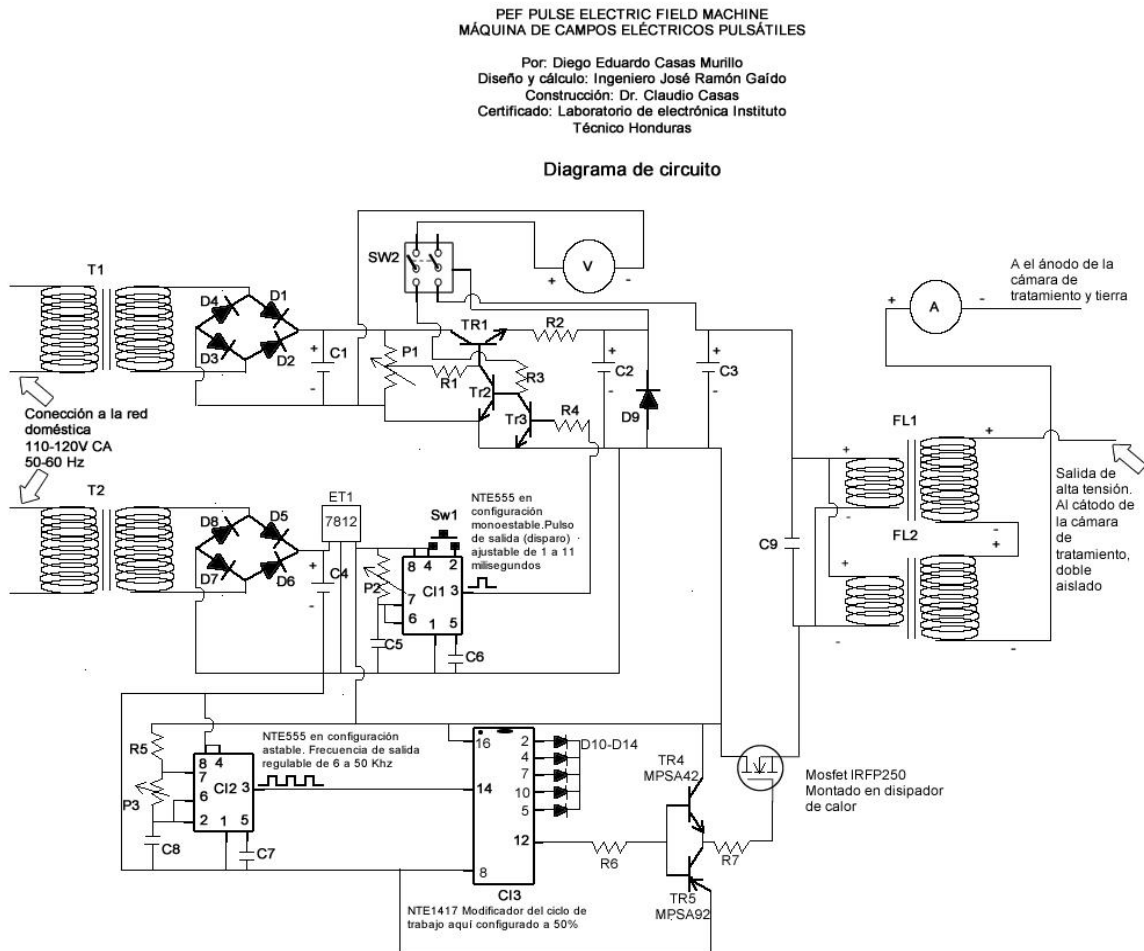


Figura 2. Diagrama de circuito generador del pulso de campo eléctrico pulsante.

El Darlington tiene una corriente eléctrica positiva entrando por la base y el colector del mismo, esto evita que la energía pase constantemente (la bloquea). El pulso de corriente que se dispara por el switch uno del NTE555 monoestable llega a la base del transistor tres y cambia la polaridad de los transistores permitiendo que el Darlington conduzca por la duración del pulso que viene desde el NTE555 monoestable.

El Darlington, al conducir el pulso deja pasar energía eléctrica que varía de acuerdo al potenciómetro. Este nuevo pulso de energía saliente pasa por un diodo rectificador para hacerlo más puro y filtrar mejor el choque eléctrico. Al mismo tiempo, evita que el choque eléctrico se regrese y pueda quemar el Darlington. El C2 y D9 aseguran que la corriente no se regrese y dañen el circuito anterior, juntos son un circuito de protección al Darlington. Luego de pasar el choque eléctrico por el C2 y D9, se dirige al switch dos que es el que permite medir la intensidad del campo eléctrico al estar hacia arriba, y al estar hacia abajo deja conducir hacia los Flybacks para la multiplicación de la tensión. Inmediatamente después de pasar el Sw2 pasa por un condensador (C3) que vuelve a filtrar cualquier ruido que pueda estar alterando el choque eléctrico. Al seguir el pulso totalmente filtrado llega a un último condensador (C9) que hace un circuito LC con los Flybacks. Se llaman circuitos LC o circuitos resonantes ya que se hace una resonancia en donde existe una frecuencia entre las bobinas y el condensador, entre menor la capacitancia del condensador aumenta la resonancia. El C9 se pone en paralelo con los Flybacks, para que resuene lo más posible dentro de los voltajes que están llegando al núcleo primario de los Flybacks y así se multiplica mejor la tensión, aumenta la energía magnética que es la que multiplica la tensión.

En este punto la parte positiva y la negativa del choque eléctrico están separadas. La parte positiva entra directamente a los núcleos primarios del Flyback, mientras que la parte negativa está conectada a un Mosfet IRFP250, el cual está montado en un disipador de calor. Este es un transistor de canal negativo que recibe la corriente negativa de un circuito NTE555 en configuración astable. Éste, a diferencia de la configuración monoestable, no necesita de un switch de disparo porque siempre está oscilando a la frecuencia determinada por la suma de resistencias de la R5 y el potenciómetro tres (P3) y su interacción con el C8. Al ser variable, uno puede regular la frecuencia, que para el estudio se mantuvo en 12.5 kHz, lo que indica que el tren de pulsos oscila 12,500 veces por segundo, dando una duración del pulso de 0.08 ms.

Al salir la oscilación del NTE555 astable entra al NTE1417, un chip que deja dividir el pulso en 10 partes y determina lo que se llama la tasa de trabajo. El chip NTE1417 tiene cinco patas conectadas para tener 50% de tasa de trabajo, lo que hace que por pulso, el 50% tiene una corriente eléctrica y un 50% de descanso (ninguna corriente), es decir que de los 0.08 ms que dura el pulso, 0.04 ms tiene una carga monopolar positiva y 0.04 ms no tiene carga alguna. Al salir la oscilación con su tasa de trabajo entra a una resistencia (R6) y luego dos transistores el Tr4 y el Tr5 que lo que hacen es amplificar el pulso, compensando

con cualquier pérdida que se ha dado en el NTE555 astable y el NTE1417. Esta oscilación amplificada y compensada sale a una terminal del Mosfet y le indica a este transistor de canal negativo a que frecuencia se quiere que se active o desactive, que va a ser igual a la que se configuro en el NTE555 astable (12.5 kHz). Para darle una frecuencia a la parte negativa de la corriente. Finalmente, la oscilación pasa a los núcleos primarios de los transformadores Flyback con una frecuencia y tasa de trabajo específica a la cual se quiere trabajar, la cual siempre es monopolar positiva para su multiplicación.

El circuito está diseñado para funcionar como la teoría binaria, es decir que la corriente eléctrica existe y no existe, por lo tanto no se utiliza una corriente bipolar, sino monopolar positiva donde el pulso se da en corriente directa positiva y luego deja de darse. Es por esto que el transformador Flyback puede multiplicar la tensión de entrada al mismo, porque oscila en una frecuencia gracias al circuito Mosfet con una reacción de nanosegundos.

El transformador es un dispositivo que convierte la energía alterna de cierto nivel de tensión (voltaje) a energía alterna de otro nivel de tensión, ya sea aumentándolo o disminuyéndolo, de acuerdo a la relación que existe entre el núcleo primario y secundario. El transformador está hecho de placas de hierro generalmente en forma de “E” una en contra de otra, teniendo al final tres diferentes barras. La barra de en medio funciona como el núcleo o bobina primaria y encima de esta, después de aislada, se hace un núcleo o bobina secundaria. En el núcleo primario, se puede cambiar el grueso del alambre que determina la intensidad (amperaje) de la energía, al mismo tiempo el amperaje se determina con el grueso del núcleo primario. Con la cantidad de vueltas del alambre alrededor del núcleo primario en relación con las vueltas del alambre en el núcleo secundario, se puede determinar el factor de aumento o disminución de tensión. Un transformador solo funciona con CA.

El transformador Flyback (FL1 y FL2) tiene un núcleo de ferrita y no de hierro como los transformadores normales. Esto es debido a que están diseñados para poder manejar frecuencias altas de hasta 80 kHz. Este se alimenta de una corriente con frecuencia que llega al núcleo primario desde el Mosfet y de acuerdo a la relación que existe con las vueltas del alambre en el núcleo secundario, se multiplica la tensión de la energía eléctrica. En la caja de los transformadores se ubicaron dos Flyback que se conectaron a modo que sus tensiones se sumaran, es decir sus núcleos primarios conectados en paralelo y sus núcleos secundarios conectados en serie. De esta manera se alcanzaban tensiones de hasta 66 kV, tensión necesaria para alcanzar los campos eléctricos de más intensidad. El tren de pulsos que se le ha amplificado la tensión sale a través de un cable de alta tensión al cátodo de la cámara de tratamiento y al ánodo de la cámara de tratamiento de acuerdo a si es su parte negativa o positiva y la parte negativa pasa antes por un amperímetro para verificar que no esté disparando trenes de pulsos con amperajes muy altos que puedan ocasionar daño al operador de la máquina.

La validación de equipo se realizó con la toma de datos de 100 disparos en rangos de tensión alto, medio y bajo (Cuadro 4). Estos datos fueron obtenidos en tiempos de 1 a 11 ms. Con tiempos superiores a este se arrojaron valores con demasiada variación debido a la saturación y calentamiento del Mosfet, y con tiempos inferiores a este los valores fueron indetectables. Además con tiempos superiores a 500 ms el Mosfet presentó un punto de ruptura, en el cual este se sobrecalienta y se quema debido a un corto circuito. El Laboratorio de Electrónica del Técnico Honduras, extendió un informe el cual avala la certificación del mismo.

Cuadro 4. Promedios y desviaciones estándares (DE) del proceso de validación de máquina generadora de campos eléctricos pulsantes.

Rango de medición (kV)	Promedio de voltaje \pm DE ^Ω (kV)	Varianza (kV)
Mínimo 25.0 - 26.0	25.20 \pm 0.60	0.37
Medio 43.0 – 44.0	43.28 \pm 0.52	0.27
Alto 61.0 – 62.0	61.46 \pm 0.63	0.39

DE^Ω Desviación estándar

Fase II: Optimización de tratamiento eléctrico para inactivar PFO en manzana.

Análisis de actividad residual enzimática. Se realizó el ensayo de cinética enzimática para cada uno de los tratamientos en presencia de diferentes concentraciones de sustrato. Se calculó el V_{max} correspondiente para cada uno y se reportó la actividad residual de PFO. Los valores más bajos de actividad residual en los cuales se obtuvo menor actividad residual de PFO, se dieron con los tratamientos tres, cuatro, cinco, seis y nueve (Cuadro 5). Estos tratamientos tuvieron los voltajes más altos a excepción de tratamiento cinco, el cual es el voltaje mínimo. No se presentó un patrón el cual explique que a mayor voltaje y tiempo total de tratamiento, la actividad enzimática disminuyo. Esto se explica por el mecanismo que los campos eléctricos pulsantes tienen para afectar a la estructura de la enzima (Ye *et al.*, 2012).

Para prevenir desnaturalización, una enzima debe mantener su estructura, la cual está estabilizada por enlaces monocovalentes débiles como puentes de hidrógenos, fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Price y Stevens, 1991). Un cambio en la magnitud de alguno de estos enlaces puede provocar la pérdida de la estructura nativa de la enzima, perdiendo así su funcionalidad. Los mecanismos de inactivación enzimática por la aplicación de campos eléctricos pulsantes no han sido completamente descritos, la tecnología actual ha generado evidencia empírica de cómo ésta inactivación podría generarse (Belloso *et al.*, 2014). Freedman y colaboradores, (2013) presentaron evidencia de que los campos eléctricos pulsantes podrían provocar

desdoblamiento irreversible en la estructura de la proteína. Este pudo ser el factor que provocó que PFO redujera su actividad en diferentes porcentajes, dependiendo de la combinación, tensión por tiempo aplicada.

A pesar de no existir una diferencia significativa en la actividad residual de PFO entre los tratamientos tres, cuatro, cinco, seis y nueve (Cuadro 5), se pretendió que en el estudio se redujera la actividad de PFO y con ello el pardeamiento en la mayor cantidad posible. El tratamiento nueve presentó una de las actividades residuales más bajas (68%) con las características del campo similares en las que Giner y colaboradores, (2001) reportaron una actividad residual de 3% de PFO mediante la aplicación de campos eléctricos pulsantes de onda cuadrada bipolar a $24.6 \text{ kV/cm} \times 6 \text{ ms}$, con la diferencia que en el presente estudio el tipo de onda aplicada fue monopolar. Ho y colaboradores, (1997) reportaron una actividad residual de PFO de 60-70%, aplicando campos eléctricos pulsantes con onda monopolar de $26 \text{ kV/cm} \times 2 \text{ ms}$ de ancho de pulso.

Los tratamientos siete, ocho y nueve (Cuadro 5) a pesar de haber sido tratados con la misma tensión (24.6 kV), el tiempo de tratamiento jugó un papel importante en la reacción de PFO. Las enzimas como toda proteína, poseen cargas, las cuales al ser expuestas a diferentes condiciones pueden reaccionar de diferente manera. La interacción entre el campo eléctrico externo y la carga residual heterogénea dentro de la proteína debido a sus características eléctricas, como la distribución de carga y el momento dipolo, son muy importantes durante la aplicación de CEP (Belloso *et al.*, 2014). Debido a los diferentes tiempos con los que el CEP fue aplicado, PFO presentó diferentes reacciones antes el mismo.

En algunos casos la aplicación de campos eléctricos pulsantes aparenta tener un efecto estimulador en la actividad de la enzima de PFO (Van Loey *et al.*, 2002). La activación puede deberse a la formación de más sitios activos o el incremento del tamaño de los mismos. Esto indica que la forma nativa existente de la enzima no es la más activa (Ho *et al.*, 1997). Los pulsos eléctricos también pudieron haber disminuido la energía libre de activación enzimática por el efecto de proximidad y orientación del sustrato, es decir, la interposición entre el sitio activo de la enzima y el sustrato. Colocándolos en la orientación relativa correcta para una reacción más rápida entre ellos, obteniendo con esto una actividad más rápida de oxidación (Ohshima *et al.*, 2007). Esto fue lo que sucedió en los tratamientos uno y siete (Cuadro 5), en los cuales las actividades enzimáticas de PFO resultaron ser superiores hasta en un 15% más a las del control (Cuadro 6). Este resultó ser un efecto indeseado e inesperado en la acción de esta enzima. Claramente se puede observar que con cambios en los tiempos y voltajes aplicados a la enzima, se pueden generar efectos de estimulación, inhibición o ningún efecto.

Cuadro 5. Promedios y desviaciones estándares (DE) del efecto de las variables independientes sobre la actividad residual enzimática en extracto de polifenol oxidasas de manzana.

Tratamiento	Carga (kV/cm)	Tiempo (ms)	Actividad Residual Enzimática (%) \pm DE ^Ω
1	18.2	110	115.0 \pm 3.65 a
2	18.2	390	97.75 \pm 5.97 c
3	31.0	110	70.00 \pm 17.3 d
4	31.0	390	65.65 \pm 5.10 d
5	15.6	250	69.60 \pm 3.67 d
6	33.6	250	75.07 \pm 11.0 d
7	24.6	52	113.0 \pm 2.38 ab
8	24.6	448	96.19 \pm 6.92 c
9	24.6	250	68.23 \pm 4.15 d
Control			100.6 \pm 5.05 bc
Coeficiente de Variación (%)			8.40

a-d Diferente letra representa diferencia significativa $P \leq 0.05$

DE^Ω Desviación estándar

El ajuste de los datos al modelo (R^2) encontrado en la superficie de respuestas fue de 0.7379 para la actividad residual de PFO, esto demuestra que un 73.79% de los datos fueron predichos por el modelo y un 26.21% de los datos no lo fueron (Cuadro 6). Esto indica que el modelo propuesto tuvo significancia estadística ya que el R^2 fue superior a 0.6, siendo este capaz de brindar una respuesta dentro de la región experimental dada la metodología utilizada.

Cuadro 6. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R^2 para la actividad residual de polifenol oxidasa en función de la carga (X_1) y el tiempo (X_2) utilizados para generar el campo eléctrico.

Coefficientes de regresión	Actividad Residual Enzimática (%)
Intercepto	70.31*
X_1	-8.65*
X_2	-5.54*
X_1^2	0.61 [‡]
X_2^2	16.91*
X_1X_2	3.183 [‡]
R^2	0.7379

X_1 : Carga (kV/cm)

X_2 : Tiempo (ms)

[‡]No significativa, * significativa a $P < 0.1$

La expresión matemática que representa la actividad residual de PFO (%) (Ecuación 13) es un modelo cuadrático de segundo orden con productos cruzados, los cuales son expresados por los coeficientes significativos, entre la actividad residual enzimática y las variables independientes. Los coeficiente que no son significativos no pueden ser utilizados en la regresión y para este caso, el coeficiente cuadrático de la variable carga kV/cm (X_1^2) y la interacción entre las variables independientes carga \times tiempo (X_1X_2) resultaron no significativas $P < 0.1$, quedando la regresión de la siguiente manera.

$$AR (\%) = 70.31 - 8.65 X_1 - 5.54 X_2 + 16.91 X_2^2 \quad [13]$$

Se realizó una prueba F con una significancia de 10%, donde se obtuvo un valor de 4.90 para el F calculado, el cual fue superior al F tabular 2.96, que indicó la significancia del modelo. Dado que el modelo presentó una falta de ajuste al mismo, con una significancia de $P < 0.1$, no se pudo concretar como un modelo predictivo. Debido a esto, el modelo se vuelve tendencial, lo cual no permitió la optimización con certeza (Thompson, 1982).

La figura tres expresa la superficie de respuestas generada por el modelo propuesto, ésta demuestra la interacción entre las variables independientes y su efecto sobre la actividad residual de PFO. Se puede observar que el punto uno que es el tratamiento nueve (24.6 kV/cm \times 250 ms), el cual fue el punto central de la metodología de superficie de respuestas; el punto dos que es el tratamiento cuatro (31 kV/cm \times 390), que es un punto factorial positivo (+1), estos dos puntos no presentaron diferencia significativa entre ellos y obtuvieron las menores actividades residuales de PFO. Dado que el modelo resultó ser tendencial y no predictivo, se decidió que el punto central debía ser utilizado como mejor tratamiento para ser comparado contra los tratamientos térmico y químico en la tercera etapa del estudio. Esto se debe a que el punto central presentó más robustez debido a que fue el tratamiento con más repeticiones (cuatro por ser el punto central). Además, estudios previos, reportaron mayores inhibiciones de actividad de PFO con potenciales eléctricos entre 24-26 kV/cm (Giner *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2007).

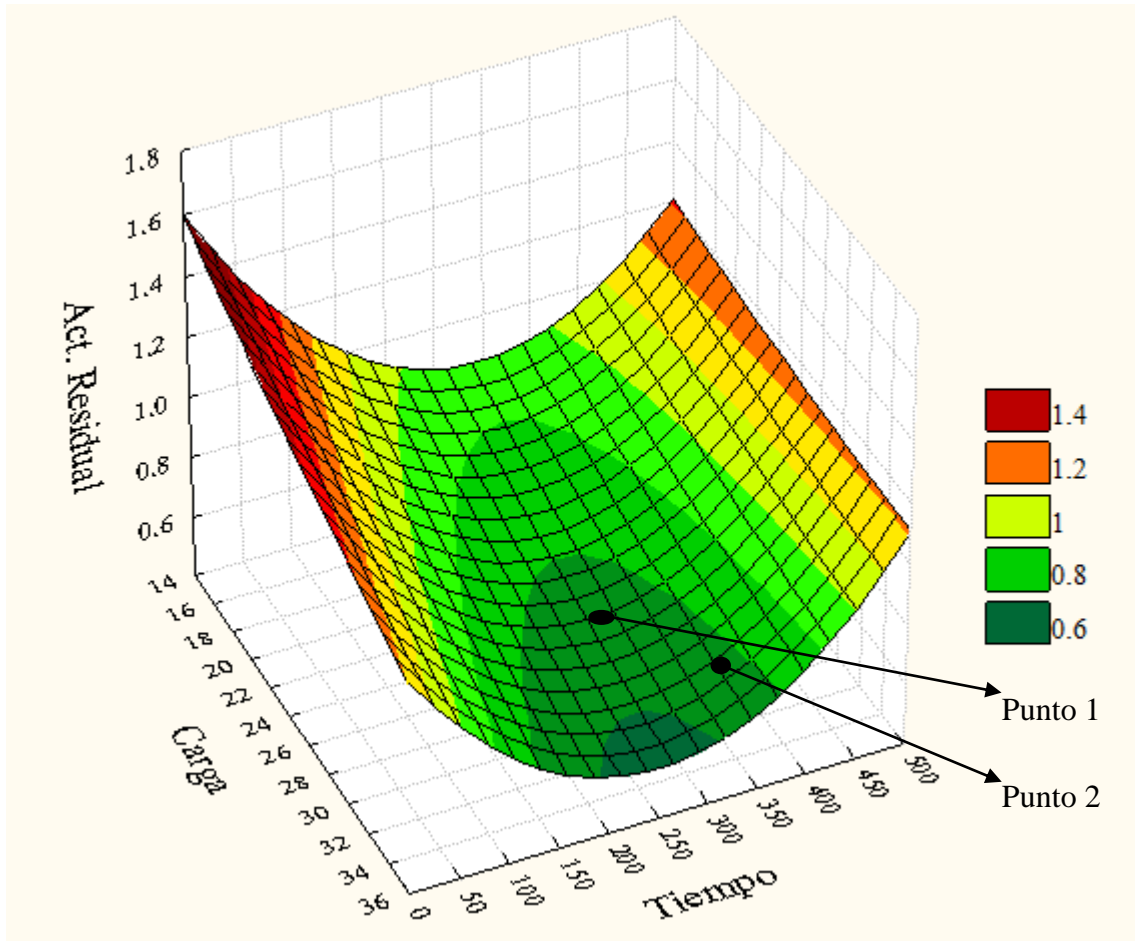


Figura 3. Efecto de la Carga (kV/cm) y Tiempo (ms), en la actividad residual de polifenol oxidasa extraida de la manzana.

Se realizó una curva de Michaelis-Menten en el cual se comparó la velocidad de reacción del mejor tratamiento (24.6 kV/cm × 250 ms) y el control (Figura 4). Se puede observar que la velocidad de reacción es claramente inferior a la del control, es decir la cantidad de PFO capaz de oxidar el sustrato fue inferior debido a lo explicado anteriormente.

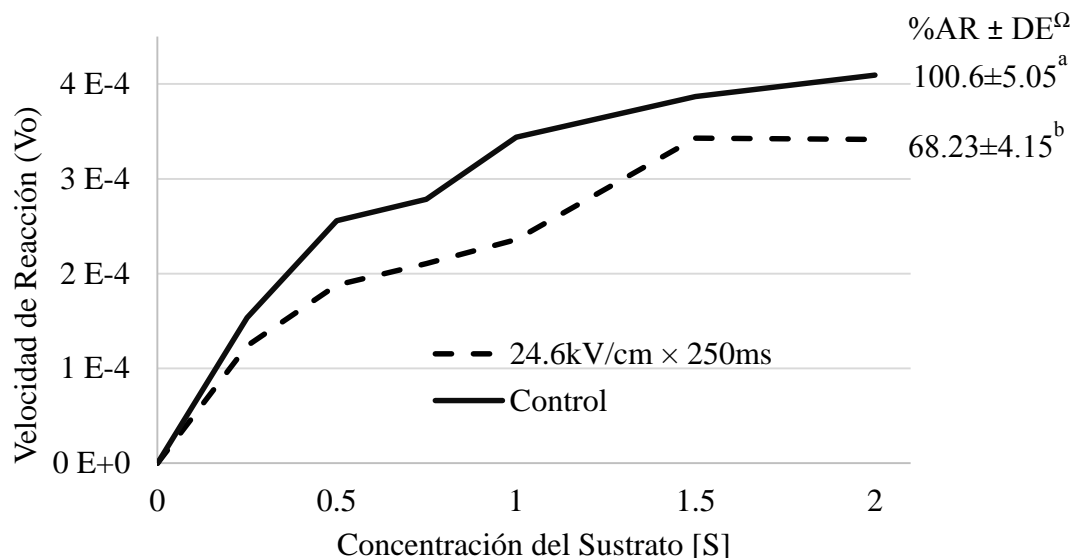


Figura 4. Curva de Michaelis-Menten del mejor tratamiento de campos eléctricos pulsantes y el control en extracto de polifenol oxidasa de manzana. AR= Actividad Residual, DE^Ω= Desviación Estandar

Fase III Comparación entre pretratamientos poscosecha.

Análisis de actividad enzimática residual. Se trató extractos de enzima de PFO con diferentes pretratamientos que se realizan en la industria. Se reportó la actividad residual de PFO una vez aplicados los diferentes pretratamientos poscosecha. Se realizó un pretratamiento químico, uno térmico y el mejor tratamiento eléctrico de la fase II, los cuales se compararon con un control, el cual no llevó tratamiento alguno. Se calculó la actividad residual de PFO comparando la actividad del control contra la actividad de las muestras tratadas eléctrica, química y térmicamente. La figura cinco muestra las curvas de Michaelis-Menten del extracto de polifenol oxidasa a una longitud de onda de 395 nm. El pretratamiento químico y térmico utilizados en el estudio, no son los tratamientos óptimos utilizados en la industria. Estos son tratamientos leves que se utilizaron para comparar las actividades residuales de la enzima posterior al tratamiento.

El tratamiento químico fue el que presentó la menor actividad residual de PFO. Sin embargo, la enzima no fue eliminada de alguna manera al aplicar este tipo de tratamiento. Lo que sucedió es que la capacidad antioxidante de ácido ascórbico previene la oxidación de los polifenoles, evitando la transformación de estos a quinonas, por lo que se previene el proceso de oxidación y no llegan a melanoidinas. Esta capacidad antioxidante se pierde al momento de que una molécula de ácido ascórbico dona sus dos electrones disponibles. Una vez la molécula de ácido ascórbico dona sus electrones y previene la oxidación enzimática, PFO continúa oxidando los polifenoles hasta llegar a un punto en el cual la

cantidad de ácido ascórbico restante no es suficiente para evitar el pardeamiento enzimático (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

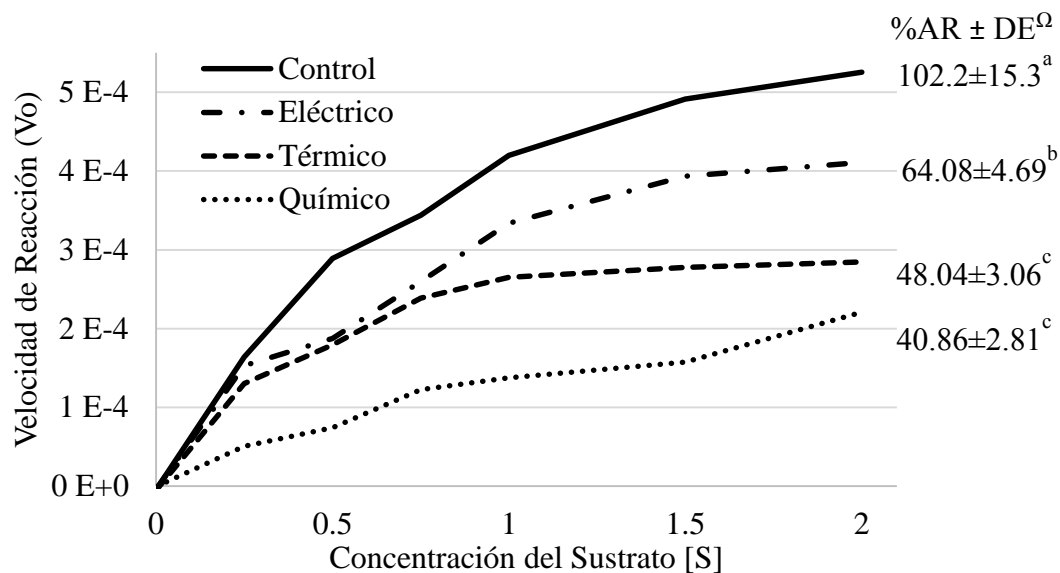


Figura 5. Curva de Michaelis-Menten para el efecto de pretratamientos en la velocidad de reacción de polifenol oxidasa de manzana.

AR= Actividad Residual, DE^Ω= Desviación Estándar

La actividad de PFO a una concentración de ácido ascórbico de 5 mg/L, se vio afectada de tal manera que tuvo un periodo inicial estático, donde la absorbancia no presentó un cambio ya que la concentración de antioxidante era suficiente para evitar por completo la oxidación enzimática. El ácido ascórbico reduce la cantidad de quinonas recién formadas evitando el proceso de oxidación enzimática (Osorio, 2008; Ghidelli *et al.*, 2013). En la concentración más alta de sustrato oxidable (catecol a 2 g/L) la actividad de PFO comenzó aproximadamente a los 25 s. En este punto la cantidad de ácido ascórbico restante no es suficiente para evitar la formación de quinonas completamente, sin embargo, las moléculas restantes de ácido ascórbico siguen donando sus dos electrones disponibles, disminuyendo la velocidad del proceso de oxidación. Al ocurrir esto la actividad enzimática se ve reducida y al hacer una evaluación de velocidades de reacción durante los siguientes 90 s la enzima no llega a una velocidad máxima clara. Por esta razón la curva de Michaelis-Menten del tratamiento químico (Figuras 5), no tiene un comportamiento logarítmico como las demás e indica más un crecimiento lineal de la velocidad (Aka *et al.*, 2013; Le Bourvellec *et al.*, 2004).

Todas las proteínas pueden llegar a desnaturalizarse, unas de manera más fácil que otras. Las enzimas son proteínas y una manera de desnaturalizar enzimas indeseadas en los

alimentos es a través de tratamientos térmicos, específicamente escaldados, debido a que en su mayoría son termo-sensibles. La adición de calor a la enzima rompe enlaces de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas, afectando estructuras cuaternarias, terciarias y hasta secundarias de la enzima. Una vez su estructura ha sido dañada ya no cumple la función para la cual está hecha (Baltacıoğlu *et al.*, 2015).

Se utilizó un pretratamiento térmico leve de 70°C durante un minuto. Este pretratamiento obtuvo en promedio una actividad residual de PFO de $48 \pm 3\%$ (Cuadro 7). Al momento de tratar térmicamente la enzima, esta no se elimina totalmente debido a que es un tratamiento leve. El tratamiento térmico disminuye la concentración de PFO en el extracto de enzima, ocasionando una desnaturalización irreversible (Chow *et al.*, 2011).

A diferencia del tratamiento térmico que es irreversible, el tratamiento químico no elimina o daña la enzima (Ghidelli *et al.*, 2013). Este último solo evita la oxidación de polifenoles de manera temporal, eventualmente la cantidad de ácido ascórbico que pueda donar sus dos electrones desaparecerá y PFO oxidará el sustrato de manera normal.

El tratamiento eléctrico presentó una mayor actividad residual de PFO que el tratamiento químico y térmico, pero siempre fue menor que el control como se muestra (Cuadro 7). La curva se ajustó al modelo logarítmico demostrando una actividad enzimática normal. Al igual que el tratamiento térmico, la desnaturalización que se hace debido al tratamiento eléctrico es irreversible y la enzima no volverá a actuar igual que antes del tratamiento.

Cuadro 7. Promedios y desviaciones estándares (DE) del efecto de los pretratamientos poscosecha aplicados a extracto de polifenol oxidasa de manzana.

Pretratamiento	Actividad Residual de PFO (%) \pm DE^Ω
Térmico (70 °C \times 1 min.)	48.04 \pm 3.0 c
Químico (5 mg/L de Ácido ascórbico)	40.86 \pm 2.8 c
Eléctrico (24.6 kV/cm \times 250 ms)	64.08 \pm 4.7 b
Control (Sin tratamiento)	102.2 \pm 15.3 a
Coeficiente de variación (%)	12.22

a-b Diferente letra representa diferencia significativa $P \leq 0.05$

DE^Ω Desviación estándar

No es adecuado elegir el mejor tratamiento netamente hablando de actividad residual enzimática. Se tiene que tomar en cuenta otros parámetros que pueden salir afectados al momento de realizar los tratamientos. En el caso del tratamiento térmico, este puede llevar a pérdidas de la calidad nutricional de alimentos como también de las características organolépticas del mismo. Compuestos importantes en la dieta del ser humano son termo sensibles, estos se pierden por la exposición a altas temperaturas, por ejemplo la vitamina

C y compuestos como las antocianinas o compuestos fenólicos (Klopotek *et al.*, 2005). Además, el pardeamiento no se puede dar solamente de manera enzimática sino también de manera no enzimática. El uso de temperaturas elevadas favorece las reacciones de pardeamiento no enzimático, la cual es conocida como reacción de Maillard.

La reacción de Maillard es la unión de un azúcar reductor con un aminoácido libre, dando colores celeste, azul, gris, marrón y negro dependiendo de la temperatura a la cual el producto ha sido sometido (Rokugawa y Fujikawa, 2015). Esto da lugar a compuestos altamente reactivos que pueden reaccionar con ciertas vitaminas, oxidándolas y producir compuestos que eventualmente oscurecen el producto y adicionalmente afectan el aroma y sabor de la fruta tratada (Anese *et al.*, 2002). Esto pudo haber ocurrido al aplicar el tratamiento térmico al extracto de PFO, brindándole un color más opaco.

Por otro lado, el tratamiento químico es un tratamiento temporal que al finalizar su capacidad de antioxidante cesará de evitar el pardeamiento enzimático y la enzima actuará de forma normal como si no tuviera tratamiento alguno. Esto es una desventaja ya que para tener una reducción prolongada de la oxidación se tendría que agregar concentraciones altas de ácido ascórbico que resultaría en un cambio de las características organolépticas del producto por un aumento de la acidez. El tratamiento con antioxidantes parece no tener efecto alguno sobre la enzima por lo que es reversible y PFO actuará libremente al terminarse la concentración de ácido ascórbico disponible para evitar la oxidación.

El tratamiento eléctrico en cambio, se ha visto que no afecta sensorialmente el producto, el cual generalmente es un jugo (Belloso *et al.*, 2014). Existen personas que incluso aclaman sentir mayor frescura en productos tratados por campos eléctricos pulsantes que en los normales sin tratamiento alguno (Bendicho *et al.*, 2003; Rowan *et al.*, 2000; Reina *et al.*, 1997). El tratamiento eléctrico reduce la actividad enzimática de manera irreversible sin aumentar significativamente la temperatura del producto por lo que se considera un proceso no térmico (Barbosa y Bermúdez, 2010). Sin embargo con las especificaciones del equipo generador de campos eléctricos pulsantes, no se alcanzó una reducción igual a la del tratamiento térmico. Se obtuvo una actividad residual de PFO del 64% (Cuadro 7). A pesar de no haber alcanzado niveles parecidos al del tratamiento térmico o químico, la reducción obtenida es significativa y se puede llegar a reconfigurar el equipo de campos eléctricos pulsantes para que sea más eficiente en la inhibición de PFO. Estudios han obtenido actividades residuales de PFO de solamente 4% con configuraciones de onda bipolar utilizando la misma intensidad del campo eléctrico, incluso con tiempos significativamente menores a los utilizados en este estudio (Giner *et al.*, 2001).

4. CONCLUSIONES

- Se diseñó y fabricó un equipo capaz de generar CEP medibles con intensidades de campo eléctrico entre 14 y 34 kV/cm y tiempos entre 1-11 ms.
- El equipo de campos eléctricos pulsantes elaborado con sus especificaciones fue eficaz en la inhibición (68% de actividad residual).
- La menor actividad residual se obtuvo con el tratamiento químico, el cual no tuvo diferencias significativas con el térmico.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis microbiológico con bacterias específicas para definir si existe una reducción significativa en la población bacteriana de un jugo o extracto.
- Realizar un estudio con ácido ascórbico para determinar el tiempo en el cual la concentración de ácido ascórbico se extingue y si ésta tuvo efecto alguno sobre la actividad enzimática.
- Cambiar la especificación de la polaridad de onda del equipo de campos eléctricos pulsantes a una onda bipolar.
- Llevar a cabo un análisis sensorial con jugo de fruta para comparar el efecto de tratamientos eléctricos, químicos y térmicos en la percepción de los consumidores.

6. LITERATURA CITADA

Alzamora, S., Guerrero, S., Nieto, A. y Vidales, S. 2004. Conservación de Frutas y Hortalizas Mediante Tecnologías Combinadas. FAO 2004. 69 p.

Anese, M., Falcone, P., Fogliano, V., Nicoli, M. y Massini, R. 2002. Effect of equivalent thermal treatments on the color and the antioxidant activity of tomato purees. *Journal of Food Science* 67(9):3442-3446

Baltacıoğlu, H., Bayındırlı, A., Severcan, M. y Severcan, F. 2015. Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PFO) as food quality related enzyme: A FTIR study. *Journal of Food Chemistry* 187(3):263-269.

Barba, F., Parniakova, O., Pereirac, S., Wiktor, A., Grimmb, N., Boussettab, N., Saraiva, J., Rasoe, J., Martin-Belloso, O., Witrowa-Rajchert, D., Lebovka, N. y Vorobiev, E. 2015. Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Journal of Food Research International* 75(1):384-391.

Barbosa, G. y Bermúdez, D. 2010. Pasteurization of milk with pulsed electric fields. *Journal of Food Science, Technology and Nutrition*. p 400-419.

Barreiro, J. y Sandoval A. 2006. Operaciones de Conservación de Alimentos por Bajas Temperaturas. Caracas, Venezuela. p 47-57.

Base SAS® 9.3 TS1M2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Belloso Martín, O., Marsellés-Fontanet, A. y Elez-Martínez, P. 2014. Enzymatic Inactivation by Pulsed Electric Fields. *Emerging Technologies for Food Processing (Second Edition)*. p 155-158.

Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. y Martín, O. 2003. Reduction of Protease Activity in Milk by Continuous Flow High-Intensity Pulsed Electric Field Treatments. *Journal of Dairy Science*. Volume 86. p 697- 703

Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. W H Freeman Editorial. New York, United States. p 323-324.

- Bi, X., Liu, F., Rao, L., Li, J., Liu, B., Liao, X. y Wu, J. 2012. Effects of electric field strength and pulse rise time on physicochemical and sensory properties of apple juice by pulsed electric field. *Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Volume 17. p 85-92.
- Box, G. y Draper, N. 1959. A Basis for the Selection of Surface Design. *Journal of American Statistical Association* 54(287):622-654
- Box, G., Hunter, J. y Hunter, W. 2005. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation and Discovery*. Second Edition. Jhon Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, United States of America. p 437-483.
- Cerón-Carrillo, T., Palou, E. y López-Malo, A. 2010. Pulsos Eléctricos: Fundamentos y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(1):9-26.
- Chow, Y., Louarme, L., Bonazzi, C., Nicolas, J. y Billaud, C. 2011. Apple polyphenoloxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid. *Journal of Food Chemistry* 129(3):761-767
- Díaz, V. 2009. Metodología de la investigación científica y bioestadística. Segunda edición. Rileditores. Santiago de Chile, Chile. p 309-315.
- Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola 1991. Aspectos técnicos sobre cuarentena y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. San José, Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería. p 12.
- FDA 2000. Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies – Pulsed Electric Fields. U S Food and Drug Administration FDA (en línea). Consultado 25 de mayo de 2014. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101662.htm>
- Fernandes, M. 1999. Estadística Aplicada. Universidad de Minho, Braga. p 247-248.
- FHIA 2006. Honduras también produce deliciosas manzanas y duraznos. Noticias de la FHIA. p 2.
- Fincan, M. y Dejmek, P. 2002. In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. *Journal of Food Engineering* 55 (3): 223-230.
- Ghidelli, C., Rojas-Argudo, C., Mateos, M. y Pérez-Gago, M. 2013. Effect of antioxidants in controlling enzymatic browning of minimally processed persimmon Rojo Brillante. *Postharvest Biology and Technology*. Volume 86. p 487-493.

Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G. y Marín, O. 2001. Effects on Pulsed Electric Field Processing on Apple and Pear Polyphenoloxidases. *Food Science and Technology International* 7(4):339-345.

Guerrero, C. 2009. Inhibición de la Actividad Enzimática de la Polifenol Oxidasa Extraída Del Banano (*Cavendish valery*) Mediante Sistemas Bifásicos Acuáticos con Isoespintanol y Ácido Ascórbico. Tesis Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Medellín, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 91 p.

Herrera, C., Bolaños, N. y Lutz, G. 2003. Química de Alimentos. Manual de Laboratorio. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 140p.

Ho, S., Mittal, G. y Cross, J. 1997. Effects of High Field Electric Pulses on the Activity of Selected Enzymes. Elsevier, *Journal of Food Engineering*. Ontario, Canada. p 69-84.

Kader, A. y Kitinoja, L. 2003. Técnicas de Manejo Postcosecha a Pequeña Escala: Manual para los Productos Hortofrutícolas (4ª Edición). Series de Horticultura Postcosecha. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapala, México. 250 p.

Klopotek, Y., Otto, K. y Bohm, V. 2005. Processing Strawberries to different products alters contents of Vitamin C, Total Phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(14):5640-5646.

Le Bourvellec, C., Le Quéré, J., Sanoner, P., Drilleau, J. y Guyot, S. 2004. Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Procyanidins and Polyphenol Oxidation Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(1):122-130.

Moro, T. 2013. Caracterización físico-química de bioplásticos elaborados por extrusión y Termoconpresión a partir de harina de maracuyá (*Passiflora edulis sp.*). Dissertação (Maestría de Tecnología de Alimentos). Instituto de Tecnología, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

Ohshima, T., Tamura, T. y Sato, M. 2007. Influence of pulsed electric field on various enzyme activities. *Journal of Electrostatics* 65(3):156-161.

Osorio, O. 2008. Influencia de Tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del pure de fresa (*Fragaria x ananassa, cv Camarosa*). Tesis doctoral Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. P 21-27.

Price, N. y Stevens, L. 1991. Enzymes: structure and functions. *Food Enzymology*, Vol I and II, ed. P. F. Fox. Elsevier Applied Science. New York, United States. p 6-25.

Reina, L., Jin, Z., Zhang, Q. y Yousef, A. 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protect* 69(9):1202-1206.

Robles, M., Robles, R., Camarillo-Cadena, M., Hernandez-Arana, A., Welti-Chanes, J. y Hernández-Sánchez, H. 2012. Efecto de los Campos Eléctricos Pulsantes sobre la Estructura de la A-Lacto albúmina Bovina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(3):373-382.

Rokugawa, H. y Fujikawa, H. 2015. Evaluation of a new Maillard reaction type time-temperature integrator at various temperatures. *Journal of Food Control*. Volume 57. p 355-361.

Rowan, N., Macgregor, S., Anderson, J., Fouracre, R. y Farish, O. 2000. Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Journal of Food Science, Technology and Nutrition* 31(2):110-114.

Toepfl, S., Heinz, V. y Knorr, D. 2005. Overview of pulsed electric field processing for food. *Journal of Emerging Technologies for Food Processing*. p 69-97.

Thompson, D. 1982. Response Surface Experimentation. *Journal of food process and preservation*. Volume 6. 155p.

Vela, J. 2004. Aproximación enzimática, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical de tomate (*Lycopersicon esculentum M.*). Implicación de polifenol oxidasa (PFO) y enzimas antioxidantes. Tesis doctoral Universidad de Alicante. Alicante, España. p 32-33.

Ye, H., Jin, Y., Lin, S., Liu, M., Yang, Y., Zhang, M., Zhao, P. y Jones, G. 2012. Effect of pulsed electric fields on the activity of neutral trehalase from beer yeast and RSM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules* 50(5):1315-1321.

Zhong, K., Wu, J., Wang, Z., Chen, F., Liao, X., Hu, X. y Zhang, Z. 2007. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PFO. *Journal of Food Chemistry* 100(1):115-123.

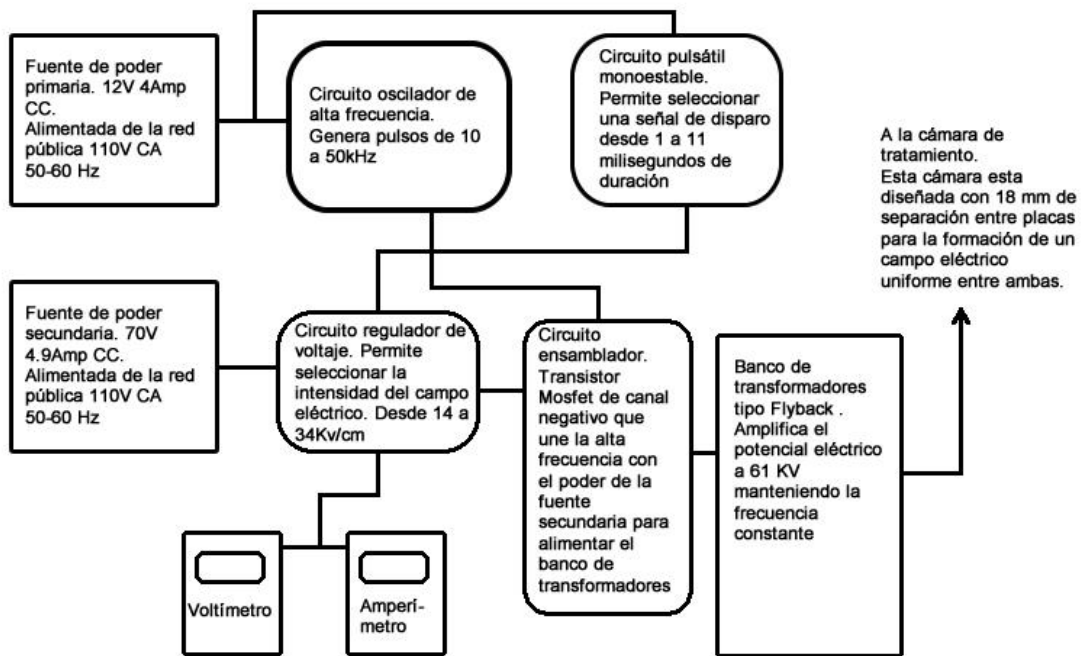
7. ANEXOS

Anexo 1. Esquema del circuito utilizado en la generación del campo eléctrico pulsante.

PEF PULSE ELECTRIC FIELD MACHINE MÁQUINA DE CAMPOS ELÉCTRICOS PULSÁTILES

Por: Diego Eduardo Casas Murillo
Diseño y cálculo: Ingeniero José Ramón Gaído
Construcción: Dr. Claudio Casas
Certificado: Laboratorio de electrónica Instituto
Técnico Honduras

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO



Anexo 2. Documento extendido por la entidad certificadora de equipo generador de CEP.

ITH

Instituto Técnico Honduras

Laboratorio de electrónica

A solicitud del Profesor José Ramón Gaído docente de esta institución se extiende la siguiente validación de datos de pruebas realizadas a una máquina de generación de campos eléctricos.

Método medición de campo eléctrico con sonda de pico de alto voltaje en los rangos mínimo, medio y alto de la máquina. La medición y los datos se toman de una muestra de 100 disparos en cada rango.

Rango mínimo 25.0 a 26.0 Kv

Voltaje promedio 25.20 Kv
Varianza 0.3654 Kv
Desviación estándar 0.6044Kv

Rango medio 43 a 44 Kv

Voltaje promedio 43.28 Kv
Varianza 0.2656 Kv
Desviación estándar 0.5153 Kv

Rango alto 61-0 a 62 Kv

Voltaje promedio 61.46 Kv
Varianza 0.3925 Kv
Desviación estándar 0.6265 Kv

Estos datos se obtienen en rangos de tiempo desde 1 hasta 11milisegundos. Tiempos mayores arrojan valores con demasiada dispersión por la saturación y calentamiento del mosfet y son indetectables en tiempos menores a 1 milisegundos.

El mosfet presenta un punto de ruptura a los 500 milisegundos por sobrecalentamiento. Hay corrientes residuales y parásitas si el campo no se descarga en la cámara o a tierra.

El amperaje de salida debe calcularse en base a los 4.5 Amperes de la fuente ya que no contamos con amperímetros de pico de alta tensión.

Capacitancia total del artefacto 50nF



Profesor Gonzalo García
Director del laboratorio de Electrónica


Ing. José Ramón Gaído
Diseñador.