

Universidad Pública de Navarra

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN*

DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

*GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*



**CAPACIDAD ANTIPARDEANTE DEL EXTRACTO DE TÉ VERDE EN  
COMBINACIÓN CON ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE PATATA  
MÍNIMAMENTE PROCESADA CV. *MONALISA***

presentado por

María Teresa Tapiador Zamorano *(e)k*

*aurkeztua*

MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS  
AGROALIMENTARIAS

*Septiembre, 2014 / 2014, Uztaila*

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS  
AGROALIMENTARIAS**

**TRABAJO FIN DE MASTER:**

“Capacidad antipardeante del extracto de té verde en combinación  
con ácidos orgánicos sobre patata mínimamente procesada cv. *Monalisa*”

realizado y presentado por

**María Teresa Tapiador Zamorano**

Las directoras PALOMA VÍRSEDA CHAMORRO y CRISTINA ARROQUI  
VIDAURRETA autorizan a **María Teresa Tapiador Zamorano** a presentar  
este Trabajo Fin de Master y lo firman para que así conste.

En Pamplona, a 10 de Septiembre de 2014

FDO.: PALOMA VÍRSEDA CHAMORRO Fdo.: CRISTINA ARROQUI VIDAURRETA

**A mis padres Juan y M<sup>a</sup> Teresa, por deberles todo lo que soy y porque sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.**

**A mi hermana Cristina, por ser como es, hacerme ver siempre el lado bueno de las cosas y cuidar siempre de mí.**

**A mi novio Fernando, por aguantarme en los momentos más difíciles, estar siempre a mi lado y ayudarme a sacar fuerzas para superar los peores momentos. No sé qué haría sin ti.**

**A mi Tita, por sus constantes ánimos y preocupación hacía mí. Por apoyarme incondicionalmente y estar presente en cualquier momento de mi vida.**

**A mis tíos Tato y Fermi, y mis primos Víctor y Alicia, por ser tan buenos como son y llenarme de alegría y felicidad cada vez que nos vemos.**

**A mis amigas y amigos de Malagón, por ser los mejores amigos que puedan existir, por todos los momentos vividos hasta ahora y por la falta que me hacen.**

**A mis directoras Cristina y Paloma y mi compañera Gloria, por su increíble capacidad de trabajo, por permitirme compartir sus conocimientos, por su paciencia y por su apoyo que han hecho posible la realización de este trabajo.**

**“El tiempo es el mejor autor, siempre encuentra el final perfecto”.**

**Charles Chaplin**

# *RESUMEN*

## RESUMEN

---

En este trabajo fin de máster se ha evaluado el empleo de diferentes tratamientos conservantes naturales sobre la patata mínimamente procesada cv. *Monalisa*, con el objetivo de sustituir al agente tradicionalmente empleado, el disulfito de sodio, el cual es perjudicial para la salud del consumidor y su uso está limitado por la FDA (Food and Drug Administration).

El objetivo que se persigue con el uso de estos agentes de origen natural, es que ofrezcan resultados similares en cuanto a la aparición de pardeamiento enzimático provocado por la enzima polifenoloxidasasa (PPO) sobre la patata cv. *Monalisa* mínimamente procesada (PMP), sin que se vea afectada la calidad nutricional y sensorial del producto.

Para alcanzar ese objetivo final se han realizado diversos ensayos para determinar la capacidad de inhibición de la PPO de los tratamientos seleccionados, los cuales son el extracto de té verde (ETV) y distintos ácidos orgánicos, como el ácido cítrico (AC) y el ascórbico (AA), donde se ha evaluado dicha capacidad en su aplicación tanto en solitario como combinándose entre ellos a diferentes concentraciones.

El desarrollo experimental se realizó tres partes. La primera consistió en evaluar el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO en patata cv. *Monalisa* (PPOp) y la capacidad de inhibición del té verde en el rango de pH de 4,5 a 7,5, dando como resultado principal que para pH 6,5 la enzima posee una actividad óptima y se produce su máxima inhibición.

El objetivo de la segunda parte experimental fue determinar la capacidad de inhibición de la PPO de los tratamientos antipardeantes seleccionados *in vitro*, donde se seleccionaron 4 concentraciones distintas de los ácidos teniendo en cuenta varios factores como son: no se puede trabajar a pH óptimo con los ácidos por su capacidad acidificante, una reducción de pH inhibe a la enzima y por debajo de pH 4,5 la PPO deja de tener actividad no pudiendo ser inhibida.

---

La aplicación en solitario de AC y AA, y la combinación de TV y AC, no dieron resultados satisfactorios en ninguna de sus concentraciones sobre la inhibición de la PPOp, en cambio, el AA mostró resultados interesantes cuando se combinaba con TV.

A partir de estos resultados se seleccionaron los tratamientos que iban a ser llevados a estudio sobre la PMP para evaluar su capacidad antipardeante *in vivo* en condiciones aceleradas: 25 °C, 75% H.R, sin ningún tipo de envase protector y en una estufa de convección, dando paso a la tercera y última parte de este trabajo.

El procesado mínimo de la patata consistió en la desinfección, lavado, pelado, cortado, tratado con las soluciones seleccionadas y con las de referencia (disulfito de sodio y té verde), escurrido y almacenado durante 48 horas en las condiciones anteriormente descritas. La evolución de la calidad y la capacidad antipardeante de los tratamientos seleccionados se determinó a partir de la medición instrumental del color y las diferentes apreciaciones sensoriales.

A partir de los resultados obtenidos en los parámetros de color y con las apreciaciones sensoriales se observa que la utilización de ETV en solitario y ETV con AA, presenta las menores variaciones de color a lo largo del almacenamiento, donde se caracteriza por unas tonalidades amarillentas producidas por la propia coloración del extracto.

Finalmente, es necesario explicar que con este último ensayo no se pudieron sacar conclusiones claras por diferentes motivos, entre los que se encontraba el propio estado de madurez de la patata (era muy temprana) y que las condiciones de estudio no fueron las adecuadas para observar completa y claramente las diferencias entre los tratamientos seleccionados.

# ÍNDICE DE LA MEMORIA

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Generalidades de la patata IV gama</b> .....	2
<b>1.2 Principales causas del deterioro</b> .....	8
1.2.1 Alteración por microorganismos.....	8
1.2.2 Pérdida de calidad sensorial: textura y sabor .....	10
1.2.3 El pardeamiento enzimático.....	11
<b>1.3 Conservación de la patata tras el procesado mínimo</b> .....	14
<b>1.4 Empleo de agentes antipardeantes sintéticos</b> .....	16
<b>1.5 Otras alternativas. Utilización de agentes antipardeantes naturales</b> .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3. MATERIAL, EQUIPOS Y MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 Materiales</b> .....	31
3.1.1 Material vegetal.....	31
3.1.2 Agentes conservantes: ácidos orgánicos .....	31
3.1.3 Agente conservante natural: té verde.....	31
3.1.4 Reactivos .....	32
3.1.5 Otros materiales.....	33
<b>3.2 Materiales</b> .....	34
3.2.1 Extracción de la PPO.....	34
3.2.2 Determinación de la actividad enzimática, porcentaje de inhibición y actividad antioxidante .....	35
3.2.3 Caracterización de la patata.....	36
3.2.4 Preparación del extracto de té verde .....	37
3.2.5 Caracterización del té verde.....	37
3.2.6 Evaluación de las soluciones antipardeantes en patata mínimamente procesada .....	37

<b>3.3 Métodos</b> .....	39
3.3.1 Extracción de la enzima polifenoloxidasa de patata (PPOp) .....	39
3.3.2 Determinación en cubetas de la actividad enzimática .....	39
3.3.3 Determinación en microplacas de la inhibición de la PPO empleando soluciones antipardeantes .....	40
3.3.4 Caracterización de la materia vegetal y de las soluciones antipardeantes .....	43
3.3.4.1 Caracterización de la patata .....	43
3.3.4.2 Caracterización del extracto de té verde .....	44
3.3.4.3 Determinación de la actividad antioxidante de los tratamientos seleccionados .....	45
3.3.4.4 Determinación del contenido en polifenoles totales de los tratamientos seleccionados .....	45
3.3.5 Efecto de las soluciones antipardeantes sobre patata mínimamente procesada. ....	46
3.3.5.1 Procesado mínimo de la patata .....	46
3.3.5.2 Evaluación de la eficacia de las soluciones antipardeantes sobre el color y las apreciaciones sensoriales en PMP .....	49
3.3.6 Análisis estadístico.....	51
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	52
<b>4.1 Evaluación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO y la capacidad de inhibición del té verde</b> .....	52
4.1.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO de patata cv. <i>Monalisa</i> ...	52
4.1.2 Efecto del pH sobre la capacidad de inhibición del té verde en la PPO patata cv. <i>Monalisa</i> .....	54
<b>4.2 Descripción de las condiciones de estudio en la inhibición de la PPOp</b> .....	58
4.2.1 Selección de concentraciones de los ácidos orgánicos .....	58
4.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante y el contenido total en fenoles de las soluciones antipardeantes .....	59
4.2.2.1 Actividad antioxidante de las soluciones antipardeantes .....	60
4.2.2.2 Contenido total en fenoles de las soluciones antipardeantes.....	61
<b>4.3 Determinación de la capacidad de la inhibición de los tratamientos antipardeantes seleccionados sobre la PPOp</b> .....	63
4.3.1 Capacidad de inhibición de las soluciones individuales de ácidos orgánicos	63



sobre la PPOp .....	
4.3.2 Capacidad de inhibición de las soluciones combinadas de té verde con ácidos orgánicos sobre la PPOp .....	67
<b>4.3 Efecto de los agentes antipardeantes sobre la vida útil acelerada en patata cv. <i>Monalisa</i> mínimamente procesada.....</b>	<b>72</b>
4.4.1 Caracterización de la patata .....	72
4.4.2 Efecto de los tratamientos aplicados sobre el color.....	73
4.4.3 Apreciaciones sensoriales del efecto de los tratamientos aplicados sobre las patatas mínimamente procesadas.....	80
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Composición química media expresada en 100 g de patata.....	3
<b>Tabla 2:</b> Grupo de agentes conservantes de dióxido de azufre y sulfitos según el RD142/2002 y su posterior modificación RD 1118/2007.....	17
<b>Tabla 3:</b> Principales ácidos naturales de algunas frutas y verduras.....	19
<b>Tabla 4:</b> Acción inhibitoria de diferentes agentes conservantes sobre el pardeamiento enzimático como alternativa a los sulfitos en PMP.....	20
<b>Tabla 5:</b> Actividad residual de la PPO en manzana <i>Golden Delicious</i> tratada con varios inhibidores.....	29
<b>Tabla 6:</b> Distribución de los diferentes reactivos en microplaca.....	41
<b>Tabla 7:</b> Puntuaciones para evaluar las apreciaciones sensoriales observadas durante el almacenamiento de la PMP.....	51
<b>Tabla 8:</b> Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPOp.....	52
<b>Tabla 9:</b> Determinación de la capacidad del extracto de té verde para inhibir la enzima PPOp.....	54
<b>Tabla 10:</b> Actividad enzimática a pH 6,5 utilizando diferentes buffers.....	57
<b>Tabla 11:</b> pH de la solución final a diferentes concentraciones de agentes antipardeantes.	58
<b>Tabla 12:</b> pH de la solución final resultante de la combinación de té verde con ácidos orgánicos.....	59
<b>Tabla 13:</b> Parámetros físicos estudiado de la patata cv. <i>Monalisa</i> .....	72
<b>Tabla 14:</b> Puntuaciones establecidas para cada atributo sobre las apreciaciones sensoriales en las PMP durante las 48 horas de almacenamiento.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Producción mundial de patata 2013.....	2
<b>Figura 2:</b> Diferentes variedades de patata <i>Solanum tuberosum</i> .....	2
<b>Figura 3:</b> Diagrama de flujo general para la elaboración de frutas y hortalizas mínimamente procesadas.....	4
<b>Figura 4:</b> Consumo per cápita de patata (kg/habitante-año) en los años 2010-2013.....	7
<b>Figura 5:</b> Ataque de microorganismos a un VMP tras el corte.....	9
<b>Figura 6:</b> Pérdida de la calidad sensorial en VMP tras el corte.....	10
<b>Figura 7:</b> Reacción del pardeamiento enzimático tras el corte en patata.....	11
<b>Figura 8:</b> Esquema de la reacción de pardeamiento.....	12
<b>Figura 9:</b> Evolución del pardeamiento enzimático en patata cv. <i>Monalisa</i> .....	12
<b>Figura 10:</b> Disociación del metabisulfito de potasio en medio acuoso y predominio de las distintas especies en función del pH.....	17
<b>Figura 11:</b> Planta <i>Camellia sinensis</i> productora del té.....	25
<b>Figura 12:</b> Extracto de té verde.....	25
<b>Figura 13:</b> Estructura básica de los flavonoides.....	27
<b>Figura 14:</b> Estructura química del ácido gálico y las cuatro principales catequinas en el té verde.....	27
<b>Figura 15:</b> Bolsa de patatas cv. <i>Monalisa</i> .....	31
<b>Figura 16:</b> Bolsa de té verde.....	32
<b>Figura 17:</b> Papel Whatman nº1, tela de quesería y microplacas utilizadas en los ensayos.....	33
<b>Figura 18:</b> Cámara frigorífica TARRE almacenamiento de la materia prima y Ultracongelador Vertical CLIMAS almacenamiento de la enzima PPO.....	34
<b>Figura 19:</b> pHmetro CRISON y batidora BOSH utilizadas en los ensayos.....	34

<b>Figura 20:</b> Bomba de vacío VACUUBRAND para poder separar la parte sólida de la líquida.....	35
<b>Figura 21:</b> Centrífuga SIGMA utilizada para la separación de fases.....	35
<b>Figura 22:</b> Criotermostato de circulación utilizado para atemperar los extractos de PPOp.....	36
<b>Figura 23:</b> Espectrofotómetro MULTISKAN con microplaca 96 pocillos.....	36
<b>Figura 24:</b> Balanza de precisión y refractómetro portátil utilizados para la caracterización de la patata.....	37
<b>Figura 25:</b> Cortadora industrial ROBOT-COUBE para lonchar las patatas.....	37
<b>Figura 26:</b> Estufa de convección y espectrofotómetro utilizados para el estudio del efecto de las soluciones antipardeantes sobre PMP.....	38
<b>Figura 27:</b> Extracto de enzima PPOp crudo y congelado.....	39
<b>Figura 28:</b> Distribución de los diferentes componentes en la microplaca para la medición de la capacidad de inhibición.....	41
<b>Figura 29:</b> Curva estándar para ensayos en microplacas sobre la actividad antioxidante (DPPH).....	45
<b>Figura 30:</b> Curva estándar para ensayos en microplacas sobre el contenido polifenólico total (Folin-Ciocalteu).....	46
<b>Figura 31:</b> Diagrama de flujo del procesado mínimo de patatas y posteriores análisis.....	47
<b>Figura 32:</b> Aclarado y loncheado de las patatas.....	48
<b>Figura 33:</b> Soluciones antipardeantes (incluido el control) aplicadas a las lonchas de patata cv. <i>Monalisa</i> .....	48
<b>Figura 34:</b> Almacenamiento de las lonchas de patata en estufa de convección a $25\pm 1$ °C y 75%H.R durante 48 horas.....	49
<b>Figura 35:</b> Sistema CIE L* a* b*.....	49
<b>Figura 36:</b> Coloraciones de las cubetas tras la medición de la actividad de la PPO a diferentes pHs.....	53

<b>Figura 37:</b> Coloraciones producidas por la reacción entre la enzima, el sustrato y el inhibidor para pH 4,5, 6,5, 7 y 7,5.....	55
<b>Figura 38:</b> Evolución del color en el sustrato catecol conforme aumenta el pH.....	56
<b>Figura 39:</b> Actividad antioxidante ( $\mu$ moles de equivalentes de Trolox/l solución) de cada tratamiento.....	60
<b>Figura 40:</b> Contenido total de fenoles (mg equivalentes de ácido gálico/ml solución).....	61
<b>Figura 41:</b> Capacidad de inhibición (%) de la PPOp del AA a diferentes concentraciones.....	63
<b>Figura 42:</b> Capacidad de inhibición (%) de la PPOp del AC a diferentes concentraciones.....	65
<b>Figura 43:</b> Microplacas con las soluciones de ácidos orgánicos tras la medición de la absorbancia a 420 nm (enzima 1 y enzima 2).....	66
<b>Figura 44:</b> Capacidad de inhibición (%) de la combinación de TV+AA sobre la PPOp.	67
<b>Figura 45:</b> Capacidad de inhibición (%) de la combinación de TV+AC sobre la PPOp.....	68
<b>Figura 46:</b> Microplacas con las combinaciones de TV+AC y TV+AA tras la medición de la absorbancia a 420 nm.....	70
<b>Figura 47:</b> Evolución de la luminosidad ( $L^*$ ) a lo largo de 48 horas almacenadas a 25 °C y 75% H.R en las PMP tratadas con las soluciones antipardeantes seleccionadas.....	73
<b>Figura 48:</b> Evolución del parámetro $a^*$ a lo largo de 48 horas almacenadas a 25 °C y 75% H.R en las PMP tratadas con las soluciones antipardeantes seleccionadas.....	74
<b>Figura 49:</b> Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 0, representando luminosidad vs. coordenada $a^*$ (a) y respecto a coordenada $b^*$ (b).....	77
<b>Figura 50:</b> Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 1, representando luminosidad vs. coordenada $a^*$ (a) y respecto a coordenada $b^*$ (b).....	77
<b>Figura 51:</b> Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 9, representando luminosidad vs. coordenada $a^*$ (a) y respecto a coordenada $b^*$ (b).....	77

<b>Figura 52:</b> Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 24,representando luminosidad vs. coordenada a* (a) y respecto a coordenada b* (b).....	78
<b>Figura 53:</b> Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 48,representando luminosidad vs. coordenada a* (a) y respecto a coordenada b* (b).....	78
<b>Figura 54:</b> Evolución en el aspecto de las PMP tras 48 horas en almacenamiento 25±1 °C y 75%H.R tras haber sido inicialmente tratadas con las soluciones antipardeantes.....	82



# *1. INTRODUCCIÓN*



## 1. INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años el patrón de consumo de alimentos ha ido variando debido a las nuevas tendencias que han sido desarrolladas, entre las que destaca la creciente demanda por alimentos frescos, naturales y que requieran un mínimo tiempo de preparación a la vez que se asegure su inocuidad higiénico-sanitaria.

Este hecho ha despertado el interés de todos aquellos que intervienen en la Industria Agroalimentaria hacia alimentos tratados con un procesado mínimo y de ahí la aparición de alimentos mínimamente procesados, también conocidos como cuarta gama o Ready-to-eat.

El consumo de vegetales mínimamente procesados ha experimentado un incremento muy acusado en su demanda debido a la creciente preocupación por mantener una buena alimentación y mejorar el bienestar en general, lo que ha hecho que se creen y se estudien nuevas técnicas para mantener la calidad y la inhibición del crecimiento microbiano durante todas las etapas de la cadena de producción y distribución.

La vida útil de las frutas y verduras mínimamente procesadas es muy corta ya que sus tejidos se encuentran vivos, y está limitada por lo general por la aparición pardeamiento enzimático, que provoca una disminución en la calidad de los alimentos como consecuencia del deterioro.

Por lo tanto, la prevención de este fenómeno ha sido y es un reto para todas las personas que intervienen en la Industria Agroalimentaria, en la que tradicionalmente se han aplicado tratamientos con agentes conservantes de procedencia química para la conservación de alimentos.

Con todo ello se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes más naturales que no sean tóxicos para los seres humanos ni para el medio ambiente y que además consigan resultados satisfactorios sin costes económicos demasiado elevados.

### 1.1 Generalidades de la patata IV gama

La patata (*Solanum tuberosum*), también conocida como papa es un tubérculo que tiene su origen en Sudamérica pero que en la actualidad, se cultiva en diversas regiones del planeta tal y como se muestra en la figura 1.

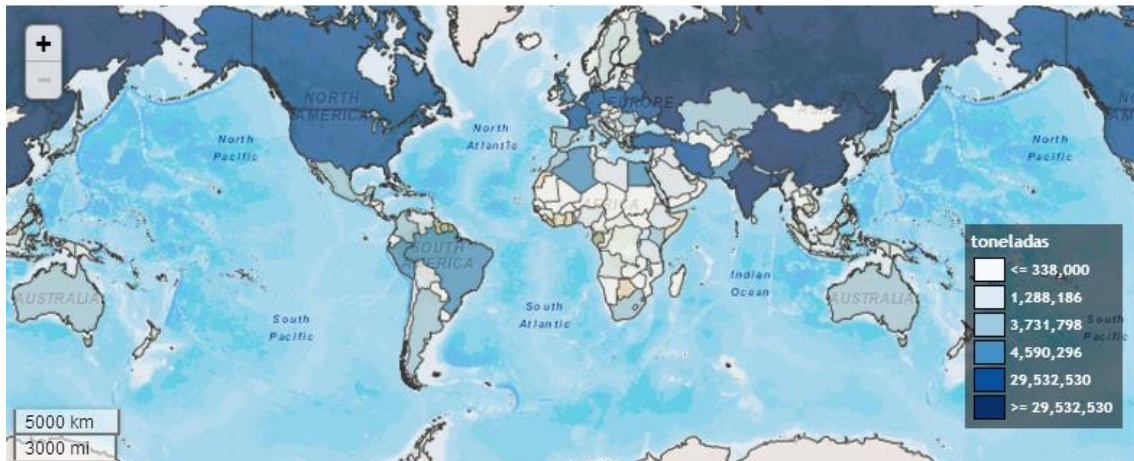


Figura 1: Producción mundial de patata 2013 (FAO, 2014)

La patata es uno de los principales alimentos en el mundo después del arroz, el trigo y el maíz (FAO, 2014) en donde se encuentran multitud de variedades como se observa en la figura 2.

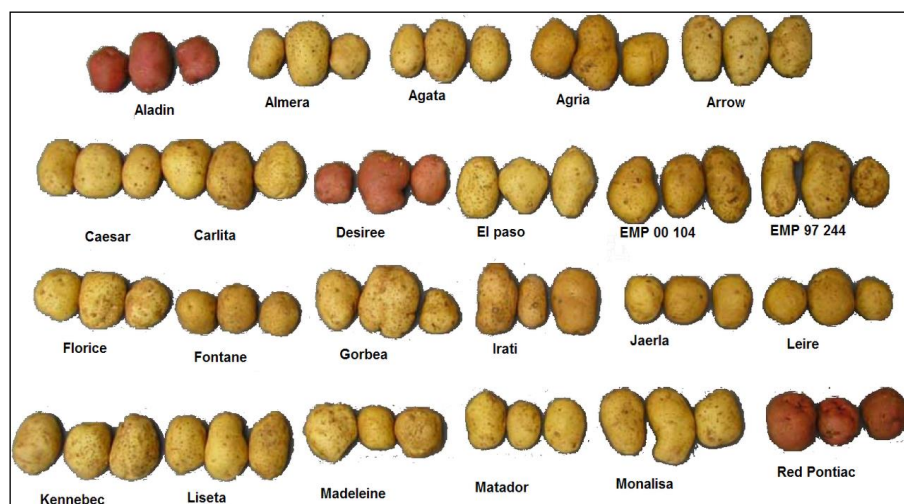


Figura 2: Diferentes variedades de patata *Solanum tuberosum* (<http://factsanddetails.com>)

En el caso de este estudio la patata seleccionada será el cultivar *Monalisa* por ser una de las variedades más susceptibles al pardeamiento enzimático como se verá en los próximos apartados y ser una patata muy usada a nivel comercial.

El tubérculo está constituido por agua en tres cuartas partes de su peso, de una relativa elevada cantidad de glúcidos, de una pequeña proporción de prótidos y de muy pocos lípidos.

La riqueza en agua y la carencia de lípidos le confieren un moderado valor energético, como puede observarse en la tabla 1, lo que la distingue de la mayor parte de los demás alimentos amiláceos.

La patata contiene la mayor parte de las vitaminas hidrosolubles. Posee una cantidad no despreciable de vitamina B<sub>1</sub> y se caracteriza sobre todo por su riqueza en vitamina C (Rouselle *et al.*, 1999). Por lo tanto, la patata es un alimento relativamente equilibrado.

**Tabla 1: Composición química media expresada en 100g de patata (Burton, 1967)**

NUTRIENTES	CANTIDAD
Agua (g)	77,5
Glúcidos (g)	19,4
Prótidos (g)	2,0
Lípidos (g)	0,1
Minerales (mg)	572,17
<b>Vitaminas más importantes (mg)</b>	
- B <sub>1</sub>	0,11
- Ácido ascórbico (C)	40

El consumo de productos vegetales frescos cortados, es una tendencia que se encuentra en gran expansión, cuyo objetivo principal es proveer al consumo un alimento listo para consumir (ready-to-eat) y con las características de los productos frescos.

Las ventajas principales de la IV gama radican en la calidad de la materia prima, manteniéndose fresca y natural cuando llega al consumidor; y en el proceso de manipulación y fabricación (productos mínimamente procesados), que requiere unas condiciones de salubridad y calidad muy elevadas (AESAN, 2012).

Entre las razones que más han condicionado la evolución de la alimentación y la tendencia al consumo de alimentos mínimamente procesados se encuentran el

aumento de la actividad económica de la mujer y las exigencias de calidad del consumidor (AESAN, 2012).

Cuando se habla de productos mínimamente procesados, aunque no existe una definición aceptada comúnmente, hace referencia a frutas y hortalizas frescas, cuyos tejidos se encuentran vivos.

Los consumidores esperan que dichos productos estén libres de defectos, que posean un grado óptimo de madurez y que además contengan una elevada calidad organoléptica y nutricional, todo ello junto con una seguridad higiénico-sanitaria garantizada (Watada y Qi, 1999).

Si bien el proceso de producción dependerá de la materia prima y del producto final que se desea obtener, es posible describir un diagrama de flujo general donde se enuncien las principales etapas, y aquellas operaciones unitarias que están presentes en la mayoría de los procesos de frutas y hortalizas mínimamente procesadas, como se puede observar en la figura 3.

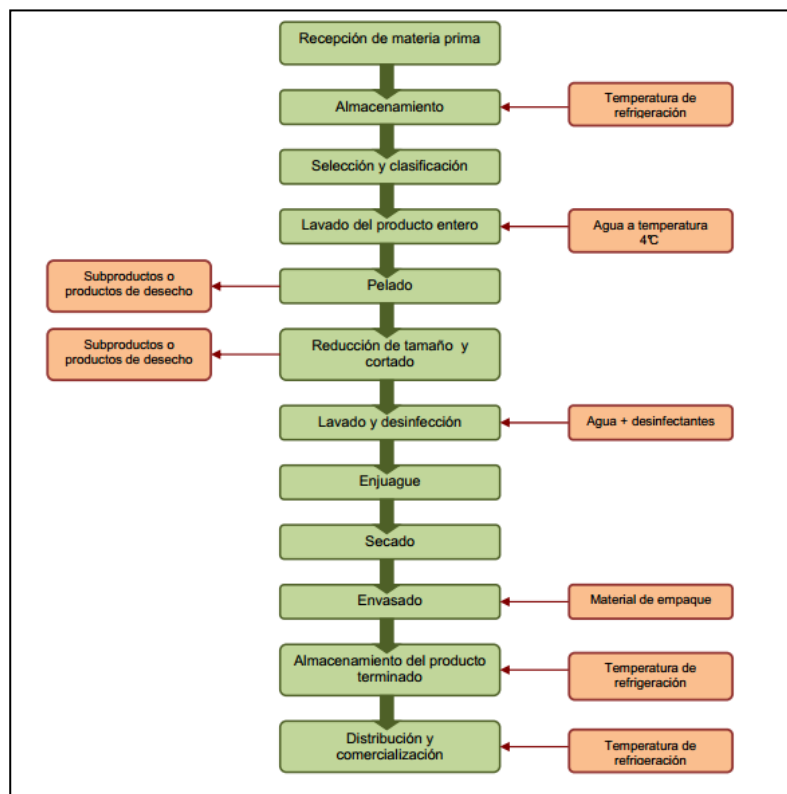


Figura 3: Diagrama de flujo general para la elaboración de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Parzanese, 2010)

El procesado mínimo comprende diferentes operaciones unitarias que, de forma general se pueden resumir en:

- Cosecha de la materia prima: se recolecta cuando se alcanza las condiciones óptimas de su madurez.

La recolección y la selección de la materia prima es un paso muy importante para obtener un producto atractivo y de elevada calidad para su posterior distribución en el mercado.

La recolección puede ser mecánica o manual y en ambos casos se debe tener el máximo cuidado posible para no dañar a los productos durante el proceso.

Un problema de la recolección mecánica, es que se recolecta sin seleccionar el tipo de madurez del producto, por lo que muchos de ellos tienen una madurez no adecuada para su procesamiento en cuarta gama.

- Selección y lavado preliminar: con esta operación se reducen los defectos y la carga microbiana.

En cuanto a la selección de esas materias primas se eliminan las partes no comestibles, lo cual genera gran volumen de residuos, aproximadamente entre un 30-70% de la materia prima original que deberá eliminarse posteriormente.

- Pelado: se puede realizar por procedimientos mecánicos, químicos o manualmente. Si el pelado se hace por procedimientos químicos, el producto no sería catalogado como fresco.

- Corte: cuanto más fino es el cortado, más lesiones en células se originan y por lo tanto, se debilita el alimento, lo que generará una aceleración a los procesos de senescencia.

En esta etapa se debilitarán los tejidos, poniendo en contacto diferentes enzimas entre ellas.

- Lavado, desinfección y aclarado: generalmente se realiza en tres fases: eliminar la materia orgánica y restos de tierra, lavar con agente desinfectante y agua fría, y aclarar por último.
- Ecurrido: se consigue eliminar el exceso de humedad. Debe de existir un equilibrio para que la deshidratación no sea excesiva y no origine lesiones, a la vez que la humedad no debe ser muy elevada para no favorecer el crecimiento microbiano.
- Selección y clasificación: se eliminan los productos que no van a ser expedidos al mercado.
- Pesaje y envasado: el envasado está sincronizado con el pesaje, y en esta etapa se incorpora la mezcla de gases adecuada.

En este caso, al hablar de productos vegetales, éstos tienen una elevada actividad de agua, por lo tanto las exigencias en modo general para su atmósfera de envasado suele ser una mezcla de  $O_2+CO_2+N_2$ , y estos envases tendrán que tener la características de ser baja barrera al paso de gases para permitir la respiración o estar perforados.

Una vez se encuentre el producto envasado se pasará a la expedición, y durante todo el procesado hasta el momento de consumo se le aplicará refrigeración, en donde se encontrará a una temperatura máxima aproximadamente de 4°C.

La refrigeración es un punto clave en el procesado ya que evita o retarda los procesos de alteración del alimento, como puede ser el pardeamiento enzimático.

El principal grupo de productos vegetales ofrecidos al mercado con un mínimo procesado está representado por la lechuga, el repollo, la zanahoria, la patata, la coliflor y el brócoli.

De este grupo, la patata ha sido impulsada por la Industria Alimentaria por las siguientes razones:

- La producción en España, estimada por la FAO en el año 2012 fue de 2.168.800 toneladas.

- La producción de patata se extiende a lo largo de todo el año teniendo diferentes épocas de recolección. Las variedades de este cultivo son: patata extratemprana, patata temprana, patata media estación y patata tardía Rioja (Rousselle *et al.*, 1999).
- En el año 2013, de toda la comida comprada, un 13,1% fueron hortalizas y patatas frescas, según datos de consumo del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2014).
- Según las estadísticas del MAGRAMA, el consumo de patatas frescas ha aumentado un 1,9% durante el año 2013 como se puede observar en la figura 4.

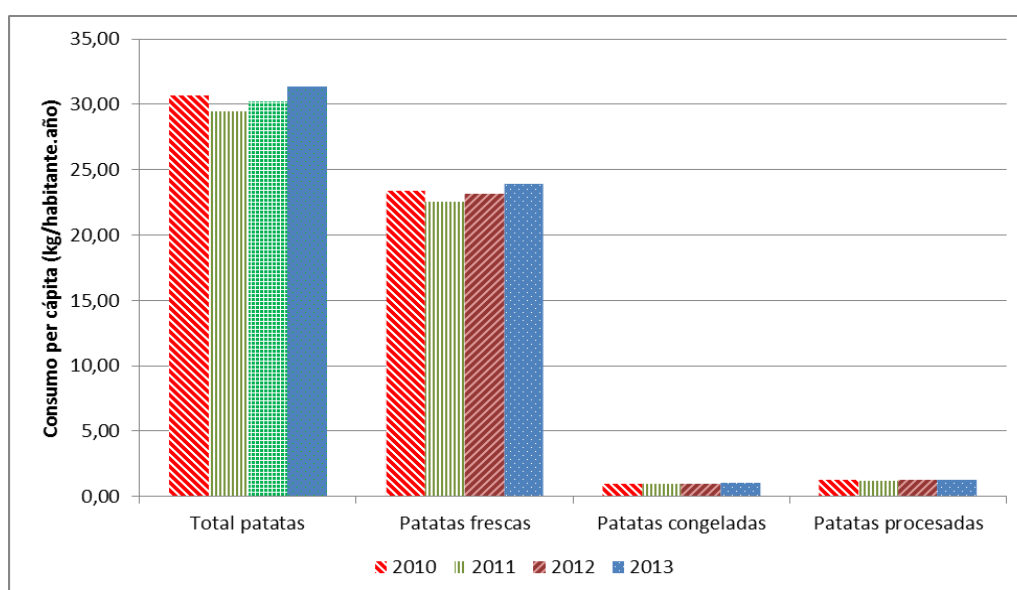


Figura 4: Consumo per cápita de patata (kg/habitante-año) en los años 2010-2013 (MAGRAMA, 2014)

- De todas las hortalizas frescas consumidas en España en el 2013, un 37,13% corresponde al consumo de patata fresca.
- Este producto posee una importancia comercial muy elevada, ya que forman parte de la dieta tradicional en muchas regiones del país, además de la composición nutricional que posee vista anteriormente.
- Debido al tiempo que requiere su preparación, sobre todo la etapa de pelado, las patatas mínimamente procesadas están viendo su auge en estos últimos años.

## 1.2 Principales causas del deterioro

Los principales objetivos que se pretenden alcanzar con la elaboración de productos mínimamente procesados según Ahvenainen (1996) son:

1. Mantener la frescura de los alimentos y ofrecerlos de una forma que facilite su utilización sin disminuir su calidad.
2. Obtener una conservación del producto suficiente que permita su distribución a los consumidores.

Llegar a alcanzar estos objetivos es complicado, ya que existen diversas causas de alteración que dan lugar al deterioro de los alimentos, en este caso para la patata.

Las principales causas que dan lugar al deterioro tras la recolección de frutas hortalizas son el desarrollo de microorganismos, principalmente hongos y bacterias, así como las reacciones químicas que pueden verse aceleradas si se produce la rotura de la cadena de frío o por daños mecánicos, desordenes fisiológicos y biológicos.

La actividad metabólica relacionada con los procesos de deterioro se acentúa después de la cosecha y se va incrementando durante las distintas etapas y condiciones de la operación.

### **1.2.1 Alteración por microorganismos**

Los vegetales mínimamente procesados (VMP) presentan características óptimas para el desarrollo de microorganismos, ya que tienen un gran contenido de nutrientes, elevada actividad de agua ( $a_w$ ), un pH de baja acidez (5,8 a 6,0) y una gran superficie de corte (Ahvenainen, 1996).

La composición de la materia prima, la contaminación inicial, el manejo postcosecha y las condiciones de procesamiento, almacenamiento y distribución, son determinantes para la proporción y tipos de microorganismos que puedan presentarse sobre el producto final (Alzamora *et al.* 1998).

La acción de diversas especies de mohos, levaduras y bacterias es una de las principales causas de alteración de los productos mínimamente procesados, ocasionando incluso un 15% de las pérdidas postcosecha.



Durante el pelado y el corte de los productos, la superficie está expuesta al aire y por lo tanto a una posible contaminación por bacterias, mohos y levaduras (figura 5).

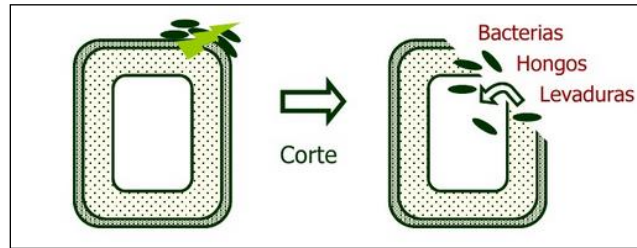


Figura 5: Ataque de microorganismos a un VMP tras el corte [González, 2013]

En los vegetales mínimamente procesados, los microorganismos más evaluados son los aerobios mesófilos y psicrotofros.

Esto se debe a que estos microorganismos revelan la calidad sanitaria del alimento, el grado de contaminación de la materia prima, las condiciones sanitarias durante el procesado mínimo y sí las condiciones de temperatura y tiempo empleadas han sido las adecuadas. Además, pueden ser utilizadas para la predicción de la vida útil en condiciones de almacenamiento.

Los principales microorganismos alterantes que pueden encontrarse en las patatas son *Erwinia spp*, causantes de podredumbres blandas, y *Pseudomonas fluorescent*, responsables de la putrefacción blanda. El crecimiento más rápido de las *Pseudomonas* a temperaturas de refrigeración hace que estas tengan mayor probabilidad de alterar los productos refrigerados (Parzenese, 2010).

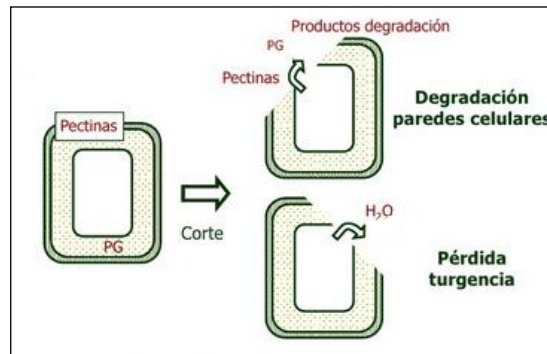
Para el caso del desarrollo y crecimiento de microorganismos patógenos en vegetales, su incidencia es mucho más baja que en la carne, los productos lácteos o los mariscos.

Tanto es así, que no se han desarrollado análisis de microorganismos patógenos como el *Cl. Botulinum* en la patata mínimamente procesada (PMP), ya que ésta no es un alimento de consumo directo, pues para su ingesta es necesario un tratamiento previo a altas temperaturas.

Por lo tanto, en este proceso de preparación, las posibles toxinas de *Cl. Botulinum* presentes en el alimento son destruidas a su temolabilidad.

### 1.2.2 Pérdida de calidad sensorial: textura y sabor

En las hortalizas y frutas enteras, el agua se encuentra contenida en los espacios inter e intracelulares, y por lo tanto no está expuesta a la atmósfera. Cuando se dañan los tejidos aumenta la velocidad de evaporación y la deshidratación del producto por la exposición de éstos a la atmósfera, lo que da lugar a una pérdida de turgencia como puede observarse en la figura 6 (Parzenese, 2010).



\*PG: poligalacturonasa. Es una de las enzimas responsables de la pérdida de firmeza (Parzenese, 2010)

Figura 6: Pérdida de la calidad sensorial en VMP tras el corte [González, 2013]

El ablandamiento se produce por cambios en las paredes celulares, donde la degradación enzimática de los componentes de la pared (celulosa, hemicelulosa y pectinas) es debida a las celulasas, hemicelulasas y sobre todo a las enzimas pépticas, dando lugar al ablandamiento de la patata (Manzanos, 2010).

Para evitar esta pérdida de textura, se añaden a las soluciones de lavado o durante el procesado de la patata sales de calcio, tales como el cloruro cálcico (Manzanos, 2010). Los iones de calcio actúan sobre las cadenas de la pared, para formar puentes entre estas aumentando su fuerza (Poovaiah, 1986).

Asimismo se produce la activación del metabolismo vinculado a la degradación, lo cual es un factor determinante para el deterioro y la reducción de la vida útil del producto, dando como resultado principalmente un aumento en la velocidad de respiración y por lo tanto, una pérdida más veloz de azúcares y otros compuestos determinantes del sabor y del aroma (Parzenese, 2010).

### 1.2.3 El pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático es uno de los principales causantes de la reducción de la calidad y la vida útil en patatas, al igual que en muchas frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

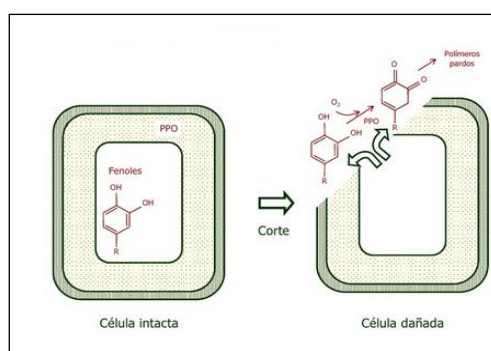
Según un estudio realizado por Whitaker y Lee (1995), se estimó que más de un 50% de las pérdidas en frutas y vegetales eran debidas al pardeamiento enzimático.

Este deterioro tiene gran importancia por el impacto visual, ya que los cambios producidos durante el almacenamiento perjudican en la aceptación organoléptica y la calidad comercial de las patatas mínimamente procesadas (Mosneaguta *et al.*, 2012)

Para que se lleve a cabo el pardeamiento enzimático, deben intervenir los siguientes componentes: el oxígeno, una enzima, un sustrato apropiado y la destrucción del tejido que permita poner en contacto directo dichos componentes.

La enzima más importante en frutas y vegetales responsable del pardeamiento, es la polifenoloxidasas (PPO), que cuando está sana e intacta, sus sustratos se encuentran en compartimentos separados (cloroplastos y vacuolas, respectivamente).

Sin embargo, cuando la célula se desorganiza al envejecer, o como resultado de daño físico o infeccioso, las enzimas y sustratos se juntan y sucede la reacción de pardeamiento enzimático (figura 7).



**Figura 7: Reacción del pardeamiento enzimático tras el corte en patata (González, 2013)**

La PPO contiene un centro activo con un núcleo de dos cobres, y a diferencia de la mayoría de las enzimas, puede catalizar 2 tipos de reacciones diferentes (Vamos-Vigyázó, 1981):

1. Hidroxilación de monofenoles en el que se producen o-difenoles
2. Remoción de hidrógenos de los o-difenoles para producir o-quinonas

Las etapas 1 y 2 son de naturaleza enzimática, y a partir de la formación de o-quinona se inician reacciones químicas no enzimáticas que producen polímeros coloreados como son las melaninas (figura 8) (Trujillo, 2004):

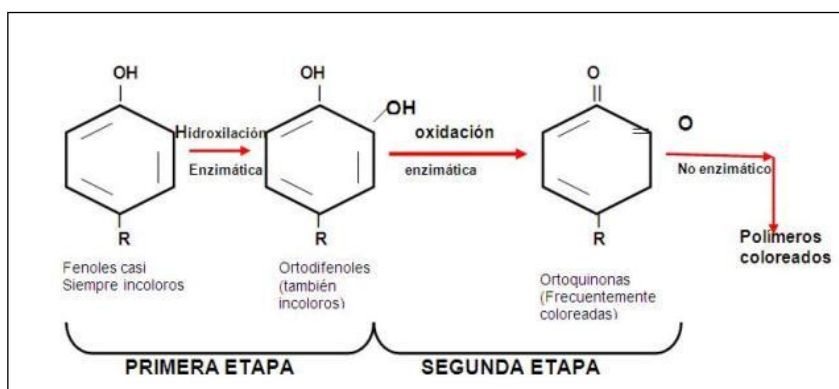


Figura 8: Esquema de la reacción de pardeamiento (Hernández, 2009)

La formación de o-quinonas es una reacción reversible en presencia de agentes reductores, mientras que la polimerización posterior es irreversible (McEvily *et al.*, 1992). Estas moléculas son muy reactivas, de rápida condensación, combinándose con grupos amino o sulfhidro de las proteínas y con azúcares reductores, dando lugar a polímeros coloreados, de elevado peso molecular y estructura desconocida. Esto se observa fácilmente en plátanos, manzanas o patatas (figura 9), ya que poseen elevados niveles de polifenoloxidasas.



Figura 9: Evolución del pardeamiento enzimático en patata cv. *Monalisa*

El contenido de enzima presente y su actividad en el alimento varía según la especie y el cultivar (Parzanese, 2010), así, Cabezas-Serrano *et al.*, (2009) estudiaron las diferencias existentes entre 5 cultivares de patata (*Agata*, *Agria*, *Almera*, *Marabel* y

*Vivaldi*) en base a diferentes atributos de calidad como el color, el contenido en agua, la actividad de la PPO, etc., para evaluar como influían estos parámetros en el potencial de pardeamiento.

Por otro lado, diferentes estudios realizados demuestran que variedades como *Monalisa* presenta una mayor actividad de la enzima PPO y es más susceptible al pardeamiento que otras variedades como *Ágata* y *Asterix* (Bobo *et al.*, 2009; Vitti *et al.*, 2011).

Además, dentro del cultivar, también influye en la actividad de la enzima el tiempo de almacenamiento y/o la época de recolección, es decir, si se trata de patatas nuevas, semitardías o tardías (Ierna y Melilli, 2014) ya que dependiendo de la época de cosecha, el contenido fenólico o el ácido ascórbico será diferente, haciendo que varíe el potencial de la reacción de pardeamiento.

Por lo tanto, la velocidad de pardeamiento dependerá de la concentración y la actividad de la polifenoloxidasas, de la cantidad y naturaleza de los compuestos fenólicos, del pH, de la temperatura, de la actividad de agua y de la cantidad de oxígeno disponible en el entorno del tejido vegetal (Mayer, 1987; Vámos-Vigyázó, 1981).

La acción de la PPO y por lo tanto de las reacciones de pardeamiento enzimático, pueden prevenirse eliminando o sustrayendo alguno de los compuestos que interviene en la reacción: O<sub>2</sub>, sustratos fenólicos, enzima PPO y cobre (componente del grupo prostético de la enzima) (Parzenese, 2010).

El cobre, situado en el centro activo de la enzima, es esencial para la actividad de la PPO y su acomplejamiento da lugar a la inhibición de la misma. Para que la enzima actúe sobre el grupo fenólico, el Cu<sup>2+</sup> ha de encontrarse reducido a Cu<sup>1+</sup>, estado en el que la enzima puede ligar oxígeno (Hernández, 2009).

### 1.3 Conservación de la patata tras el procesado mínimo

Las condiciones de conservación de los productos mínimamente procesados, en este caso la patata, influyen de una forma determinante en el metabolismo vegetal, y en consecuencia, en la calidad del producto almacenado, es decir, en la apariencia, firmeza/textura, contenido en vitaminas, etc.

El factor más crítico en la conservación de productos mínimamente procesados es la temperatura. Watada y Qi (1999) señalan que para una temperatura por encima de los 10 °C, la tasa de respiración aumenta sustancialmente provocando un aumento significativo de CO<sub>2</sub> debido a una mayor actividad metabólica y por lo tanto provocando un deterioro del producto al mismo ritmo.

Por lo tanto una conservación a bajas temperaturas es esencial para mantener una buena calidad durante el almacenamiento, distribución y transporte, ya que de no ser así, se producirá una pérdida irreversible de su calidad.

La aparición de condensación es el primer problema que se produce cuando un órgano vegetal refrigerado pierde la cadena de frío. Esta pérdida implica además, una elevación de la temperatura del vegetal que acelera sus actividades metabólicas, especialmente las de enzimas responsables del pardeamiento que se vio anteriormente, así como una proliferación de microorganismos (Trujillo, 2004).

Además del control de la temperatura, García y Barret (2002) sugieren diferentes métodos físicos y químicos disponibles para reducir el pardeamiento enzimático, los cuales incluyen el uso de atmósferas modificadas, uso de aditivos como inhibidores enzimáticos, captadores de oxígeno, acidulantes, sustratos competitivos y compuestos que reaccionan con los productos de reacción intermediarios antes de que éstos puedan producir pigmentos coloreados.

Para evitar la pérdida de calidad se puede utilizar la tecnología de envasado en atmósfera modificada, que consiste en el reemplazo del aire atmosférico por una mezcla de gases, generalmente N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, con ello se logra reducir la velocidad de respiración, la actividad metabólica, la pérdida de humedad del producto y la prevención del crecimiento de microorganismos.

Así pues, la respuesta de los productos frescos y cortados en un envasado en atmósfera modificada dependerá del tipo de producto, del grado de madurez y de las prácticas antes y después de la cosecha, pero en todos los casos, deben ir acompañados un buen control de la temperatura durante toda la cadena de producción y comercialización del producto, siendo la temperatura ideal inferior a 5°C.

Por otro lado, se ha logrado mejorar los procesos para reducir los daños físicos durante la preparación y manipulación de las frutas y hortalizas frescas cortadas, mejorar las condiciones de higiene y las buenas prácticas de manufactura, reduciendo de esta manera el riesgo de contaminación.

Con todo ello, es posible utilizar combinaciones de los anteriores métodos de conservación físicos, de forma que se aprovechen las ventajas del sinergismo de los distintos obstáculos o barreras que ofrece cada uno de ellos.

#### 1.4 Empleo de agentes antipardeantes sintéticos

El uso de agentes químicos para la conservación de patatas mínimamente procesadas tiene como objetivo evitar el crecimiento microbiano y controlar/limitar las reacciones enzimáticas.

Este trabajo se va a centrar en el uso de agentes conservantes que controlen y eviten en la manera de lo posible el pardeamiento enzimático, que es la causa principal de pérdida de calidad en PMP.

El modo de acción de los agentes antipardeantes para inhibir a la PPO y prevenir el pardeamiento enzimático son (a) inhibiendo la enzima, (b) eliminando uno de los dos sustratos de la reacción (oxígeno o polifenoles), (c) reaccionando con los productos de la reacción de la enzima para inhibir la formación de pigmentos coloreados procedes de pasos secundarios de una reacción no enzimática, (d) disminuyendo la temperatura y/o (e) reduciendo el pH, existiendo numerosos estudios como Mosneaguta *et al.*, (2012), Calder *et al.*,(2011), Hwang *et al.*, (2002), Landi *et al.*, (2013), entre otros.

La aplicación de compuestos químicos que poseen propiedades antipardeantes, está reglamentada por diferentes organismos como la FAO, la OMS, la FDA, etc., existiendo ciertos productos en los que su aplicación o dosificación están restringidos total o parcialmente debido a consideraciones toxicológicas en el ser humano y/o impactos sobre las características organolépticas en sabor, aroma, color y textura del alimento.

Además de las restricciones legales, existen otras dificultades para el empleo industrial de agentes antipardeantes como son que tienen poca disponibilidad comercial, se posee poco conocimiento sobre ellos, presentan un alto coste o tienen un método de aplicación que no rentable.

Los tipos de inhibidores más usuales son los sulfitos, agentes antioxidantes o reductores, acidulantes y compuestos quelantes. De entre todos ellos, los sulfitos han sido los tradicionalmente usados para prevenir la pérdida de la calidad, especialmente representada por el pardeamiento enzimático.

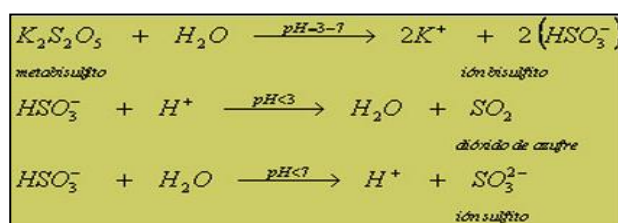


Los agentes sulfitantes han sido ampliamente utilizados a lo largo de la historia debido a sus múltiples funciones. Pueden encontrarse en productos farmacéuticos, bebidas y alimentos. Incluyen el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y distintos sulfitos inorgánicos que generan SO<sub>2</sub> en las condiciones de uso. En la tabla 2 se pueden observar el grupo de conservantes que forman los sulfitos según el RD 1118/2007.

**Tabla 2: Grupo de agentes conservantes de dióxido de azufre y sulfitos según el RD142/2002 y su posterior modificación RD 1118/2007**

Nº E	Denominación
E-220	Dióxido de azufre
E-221	Sulfito sódico
E-222	Sulfito ácido de sodio
E-223	Metabisulfito sódico
E-224	Metabisulfito potásico
E-226	Sulfito cálcico
E-227	Sulfito ácido de calcio
E-228	Sulfito ácido de potasio

El mecanismo de acción de los sulfitos es inhibir irreversiblemente a la PPO mediante modificaciones de la estructura de la enzima (Sayavedra-Soto *et al.*, 1986), en donde también se sabe que tiende a actuar como agente reductor mediante la donación de protones, como puede observarse en la figura 10:



**Figura 10: Disociación del metabisulfito de potasio en medio acuoso y predominio de las distintas especies en función del pH**

El metabisulfito es especialmente eficaz en medio ácido, inhibiendo bacterias y mohos y en menor grado, levaduras. Durante el cocinado o el procesado de los alimentos, el anhídrido sulfuroso, compuesto principal de los sulfitos, se pierde por evaporación, o bien por combinación de otros componentes

Los sulfitos han sido utilizados en el procesado de frutas y verduras para inhibir la actividad de la PPO en cantidades desde 5000 ppm (0,5%) hasta 20000 ppm (2%),

dando un nivel residual que va desde 10 hasta 10000 ppm, dependiendo de la concentración empleada y del alimento (Trujillo, 2004).

La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en la primavera de 1990, limita en parte el uso, en Estados Unidos, de sulfitos en frutas y verduras, ya que se usaban sin ningún control en alimentos que eran servidos y vendidos al consumidor sin empaquetar o sin etiquetar, causando la alerta preventiva de la FDA y aumentando el interés por encontrar sustitutos a este agente (Ahvenainen, 1986).

Según la FDA, aproximadamente 1 de cada 100 personas es sensible a los sulfitos que se encuentran en los alimentos y la mayoría son asmáticas, lo que sugiere un vínculo entre el asma y estos conservantes. Dichas personas pueden experimentar dolores de cabeza, problemas de respiración y erupciones cutáneas. En los casos más graves, los sulfitos pueden causar la muerte mediante el cierre de la vía aérea por completo, lo que lleva a un paro cardíaco.

En España, el uso del dióxido de azufre y los sulfitos se permite en determinadas condiciones, en una amplia variedad de alimentos. La reglamentación española aplicable es el RD 140/2002 y su modificación, RD 1118/2007, referente a los aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes, en donde su uso se autoriza en diversos alimentos como patatas, vino y cerveza, galletas, etc.

Según la Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios, Codex Stan 192-1995, el uso de sulfitos expresado en contenido de anhídrido sulfuroso,  $SO_2$ , en patatas mínimamente procesadas está permitido hasta una cantidad máxima que no supere una residualidad de 50 ppm.

Con todas las desventajas mostradas por parte de los sulfitos en el ámbito de la salud humana surge la necesidad de reducir la cantidad de sulfitos y/o utilizar otros agentes conservantes que actúen sobre componentes implícitos en el fenómeno del pardeamiento y que sean seguros para los consumidores.

A partir de ese momento, se buscan diversos productos de origen natural que actúen como agentes antipardeantes con los que se obtengan resultados satisfactorios

en la reducción del pardeamiento y en el deterioro de la calidad organoléptica de frutas y verduras, además de no ser perjudiciales para la salud humana.

Los compuestos antipardeantes más utilizados como alternativas a los sulfitos son los ácidos orgánicos. Éstos pueden encontrarse de forma natural en las frutas y hortalizas, como puede observarse en la tabla 3, acumulados a consecuencia de la fermentación o adicionados durante el procesado (Wiley, 1997).

**Tabla 3: Principales ácidos naturales de algunas frutas y verduras (Wiley, 1997)**

Frutas y hortalizas	Principales ácidos
Manzana	Málico, quínico, a-cetoglutárico, oxalacético, cítrico, pirúvico, fumárico, láctico y succínico
Grosella	Cítrico, tartárico, málico y succínico
Cereza	Málico, cítrico, tartárico, succínico, quínico, shiquímico, glicérico y glicólico
Higo	Cítrico, málico y acético
Pera	Málico, cítrico, tartárico y oxalácido
Piña	Cítrico y málico
Judías	Cítrico, málico, succínico y fumárico
Brócoli	Málico y cítrico
Champiñón	Lactarímico, cetoesteárico, fumárico y alantoico
Patata	Málico, cítrico, oxálico, fosfórico y piroglutámico
Tomate	Cítrico, málico, oxálico, succínico, glicólico, tartárico, fosfórico, clorhídrico, sulfúrico, fumárico y galacturónico
Zanahoria	Málico, cítrico, isocítrico, succínico y fumárico

Diferentes ejemplos de agentes antipardeantes que actúan mediante distintos mecanismos de acción para inhibir a la PPO y evitar la reacción de pardeamiento se muestran en la tabla 4, donde además de presentar los ácidos orgánicos más utilizados, aparecen otros agentes antipardeantes que forman parte de la búsqueda de alternativas a los sulfitos y que serán estudiados más adelante.

Tabla 4: Acción inhibitora de diferentes agentes conservantes sobre el pardeamiento enzimático como alternativa a los sulfitos en PMP (Lamikanra, 2002)

Inhibidor del pardeamiento	Efecto/Acción	Comentarios
<b>Acidulantes</b>		
Ácido Cítrico	Doble efecto: descenso de pH y quelante del Cu del sitio activo de la PPO	Usado en combinación con otros agentes. La inhibición del pardeamiento se puede lograr reduciendo el pH 2 unidades aproximadamente del pH óptimo de la PPO <sup>(1)</sup>
Otros ácidos orgánicos: tartárico, málico	Descenso de pH	Disponibilidad limitada debido al coste
Ácido inorgánicos: fosfórico e hidrocórico		Efecto sensoriales en el sabor
<b>Reductores (Agentes reductores; Antioxidantes)</b>		
Ácido ascórbico	Reducción de o-quinonas a difenoles incoloros	Efecto temporal. Puede causar malos olores y/o colores. Penetración insuficiente en el interior de los tejidos de los alimentos
Ácido eritórbico		Se agota más rápido que el ácido ascórbico
Compuestos sulfidrilos: L-cisteína	Reduce las o-quinonas a difenoles de baja coloración	Formación de sabores desagradables. Más efectivo que el ácido ascórbico
<b>Agentes formadores de complejos</b>		
Ciclodextrinas (oligosacáridos cíclicos)	Formación de complejos con los sustratos de PPO. Atrapamiento de sustratos o productos de la PPO	La formación de complejos no es específica. Eliminación potencial de los componentes del color y/o sabor. Se sugiere el uso combinado con otros agentes (acidulantes, quelantes, reductores)
<b>Agentes quelantes</b>		
EDTA (Etilendiaminotetraacético)	Unión del Cu en el sitio activo de la PPO y éste queda disponible en el tejido	Usado comúnmente en combinación con otras sustancias antipardeamiento. Niveles hasta 500 ppm están permitidos para EDTA disódico y EDTA cálcico
<b>Inhibidor de la enzima</b>		
4-hexilresorcinol	Inhibición directa de la enzima	Uso no aprobado en frutas y vegetales. Soluble en agua y químicamente estable.

(1): Whitaker y Lee, 1995; Mosneaguta *et al.*, 2012

Los ácidos orgánicos tienen la característica común de reducir el pH, donde su capacidad acidulante varía de unos a otros.

El disminuir este parámetro hasta valores de 4 retarda considerablemente la actividad de la PPO, cuya actividad óptima se encuentra entre un pH de 5 - 7 y a una temperatura de 25 °C (Hernández, (2009), Mosneaguta *et al.*, (2012); Parzenese, (2010), Rico *et al.*, (2007)), evitando el pardeamiento enzimático, por lo que es un método muy empleado en la Industria Agroalimentaria.

Además, ajustar el pH de un alimento por debajo de 4,6 está considerado como barrera para el crecimiento y esporulación del *Cl. botulinum* (la acidificación constituye una medida de seguridad utilizada en frutas y hortalizas mínimamente procesadas).

### **ÁCIDOS ORGÁNICOS**

Los ácidos orgánicos más utilizados en productos mínimamente procesados son:

➤ Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) → es el principal ácido orgánico en frutas tales como arándanos, higos, fresas, etc., y de hortalizas como judías y tomates como se ha podido ver en la tabla 3.

La forma de actuar del ácido cítrico es reduciendo el pH, ya que es un acidulante, y secuestrando el cobre en el sitio activo de la enzima, por su capacidad quelante, y a menudo se utiliza en combinación con otros agentes antipardeantes como el ácido ascórbico o los sulfitos.

También inhibe el crecimiento bacteriano debido a que produce la quelación de los iones metálicos que son esenciales para el desarrollo microbiano. Las concentraciones utilizadas en las soluciones antipardeantes van entre un 0,1 y un 5%.

Trujillo, Y (2004) consiguió aumentar la vida útil en la PMP de 10 a 14 días, reduciendo la concentración de disulfito de sodio del 0,5% al 0,1% en combinación con 0,5% de ácido cítrico, obteniendo, además, un efectivo control sobre el crecimiento microbiológico

➤ Ácido ascórbico → es otro de los agentes conservantes orgánicos más estudiados con propiedades antioxidantes y su enantiómero L- del ácido ascórbico se conoce popularmente como vitamina C.

Este ácido o su isómero, el ácido iso-ascórbico retarda el pardeamiento enzimático y otras reacciones oxidativas en virtud de su poder reductor: reduce las o-quinonas a sus difenoles originales (Sapers y Miller, 1992).

El efecto beneficio de este ácido se le atribuye a su poder de secuestrar el oxígeno y proteger los dobles enlaces, o de formar una barrera de difusión de oxígeno hacia el interior del producto.

La principal desventaja es que se oxida irreversiblemente a ácido dehydroascórbico durante el proceso de reducción, permitiendo así el pardeamiento por su agotamiento, es decir, su efecto es temporal.

Este compuesto normalmente se añade junto con el ácido cítrico, que tiende a mantener un pH ácido y también actúa como quelante, como se mencionó anteriormente.

Según la norma del Codex Stan 192-1995, la cantidad máxima de ácido L-ascórbico en hortalizas mínimamente procesadas es de 500 ppm, y para el caso del cítrico no se especifica ningún máximo.

En el mismo estudio de Trujillo, Y (2004), la combinación de ácido cítrico (0,5%), ácido ascórbico (0,5%) y disulfito de sodio (0,1%) mejoró los resultados obtenidos cuando se aplicaba únicamente 0,5% de disulfito sobre el pardeamiento enzimático, pero no se logró la vida útil de 14 días obtenida con el tratamiento combinado de cítrico y disulfito.

Ma *et al.*, (2010) observaron que la combinación de 1,25% de ácido ascórbico y 1,25% de ácido cítrico no era eficaz para retrasar el pardeamiento enzimático, pero cuando esta combinación se encontraba en atmósfera modificada, su efecto en patata *Russet* era comparable a la acción de los disulfitos a lo largo de 16 días a 5 °C.

Este mismo resultado observaron Laurila *et al.*, (1998), es decir, la combinación de cítrico y ascórbico es eficaz y comparable al efecto de los disulfitos sobre la patata cuando estos se encuentran combinan con atmósfera modificada, ya que la acción de éstos frente a la PPO no es totalmente duradera.

Por lo tanto, con estos resultados obtenidos por diferentes autores, se concluye que el uso combinado de ácido cítrico y ácido ascórbico necesita el uso de otro agente conservante, como el disulfito, o de una barrera física, como la atmósfera modifica, para obtener buenos resultados sobre la inhibición de la PPO y así retrasar/evitar el pardeamiento enzimático, y con ello aumentar la vida útil de la PMP.

### **OTROS COMPUESTOS ANTIPARDEANTES**

Como sustitutos a los sulfitos se encuentran otros agentes antipardeantes que pueden ser utilizados en solitario o en combinación con ácidos orgánicos, como muestra la tabla 4 anteriormente expuesta.

El 4-hexilresorcinol es un compuesto m-difenólico, derivado del resorcinol, que está estructuralmente relacionado con los sustratos fenólicos, el cual tiene un efecto inhibitorio competitivo con la PPO. La legislación (UE 1129/2011) permite su uso (E-586) en gambas para la prevención de la melanosis

Este químico se ha usado con seguridad en medicamentos durante mucho tiempo y es aceptado por la FDA para su utilización en la prevención sobre los cambios de color en el camarón, el cual demostró ser más efectivo que el sulfito en base peso/peso (Iyengar *et al.*, 1991).

Otro estudio realizado por Reyes-Moreno *et al.*, (2001) tenía por objetivo optimizar la combinación de este agente (4-hexilresorcinol) y ácidos orgánicos, en este caso el ácido ascórbico, en cuanto a concentración y tiempo de remojo, para prevenir el pardeamiento enzimático en cubos de patata variedad *Alpha*.

Dentro del grupo de agentes reductores se encuentran aminoácidos que contiene sulfuro como la L-cisteína y la N-Acetil-L-Cisteína (NAC).

NAC no presenta los problemas de sabor y olor que se observan con el uso de L-cisteína, pero uno de sus inconvenientes es su precio respecto a las cantidades recomendadas para que sea efectivo

Por su grupo sufridilo (-SH), estos compuestos son excelentes inhibidores del pardeamiento enzimático, ya que reaccionan irreversiblemente con las quinonas producidas por la polifenoloxidasas, originándose tio-ésteres que son compuestos incoloros (Trujillo, 2004).

Gunes y Lee (1997) obtuvieron resultados muy satisfactorios en la inhibición del pardeamiento durante 3 semanas a 2 °C en atmósfera modificada sobre rodajas de patata cuando eran sumergidas durante 3 minutos en la solución de 0,5% L-cisteína y 2% ácido cítrico. Los resultados eran similares a la mezcla de 5% ácido ascórbico y 0,1% disulfito, aunque L-cisteína y cítrico le conferían mejor presencia.

La combinación de N-acetilcisteína (0,25 M), ácido cítrico (0,25 M) y 4-hexilresorcinol (0,001 M) consiguió retrasar el pardeamiento en lonchas de patata durante 21 días de almacenamiento a 10 °C (Buta y Moline, 2001).

Aparte de la combinación de diferentes agentes antipardeantes, también es posible aprovechar el sinergismo que ofrece la unión de los métodos físicos con la combinación dichos agentes, así se obtendrán las distintas ventajas de las barreras que ofrece cada método.

Por último, vistos los inconvenientes que ofrece el NAC relativo a su coste y que para el caso del 4-hexiresorcinol solo está permitido su uso en gambas, este trabajo va a estudiar el efecto de los ácidos orgánicos (ascórbico y cítrico) en combinación con un agente conservante natural como alternativa al uso de sulfitos, como es el caso del té verde, para observar si existen sinergias entre ellos y se consigue una inactivación de la PPO y por lo tanto un retraso en el pardeamiento enzimático.



### 1.5 Otras alternativas. Utilización de agentes antipardeantes naturales

La problemática que han ocasionado los sulfitos como agente antipardeante sobre las personas asmáticas, ha llevado a la búsqueda de otras alternativas que ofrezcan una eficacia similar para la conservación de la patata mínimamente procesada sin comprometer su sabor ni su inocuidad.

Dentro de las alternativas a dicho agente químico, aparecen otros agentes como los ácidos orgánicos, el 4-hexilresorcinol, el NAC, y sus combinaciones entre ellos como se ha comentado anteriormente.

Sin embargo el uso de estos agentes presenta diferentes inconvenientes: no son tan eficaces como los sulfitos, su acción es temporal, pueden dar lugar a la aparición de olores y sabores extraños, pueden no conseguir inhibir la enzima completamente, pueden resultar caros, no están autorizados para su aplicación en alimentos, etc.

En los últimos años ha ido aumento la preocupación por parte del consumidor por alimentos más saludables, exigiendo a la vez mayor calidad y comodidad en su uso, a la vez que crece la demanda por alimentos frescos y naturales.

Las especias, hierbas aromáticas o los tés han sido utilizados a lo largo de los años tanto para conservar los alimentos como por sus propiedades antisépticas y medicinales, o para conferirles sabor.

El té es el producto elaborado a partir de las hojas y las yemas de la planta *Camellia sinensis* (figura 11), siendo la segunda bebida más consumida del mundo, muy por delante del café, la cerveza, el vino y las bebidas gaseosas (Cabrera *et al.*, 2006).



Figura 11: Planta *Camellia sinensis* productora del té

Dependiendo del proceso de fabricación, los tés se clasifican en tres grupos: 1) no fermentados, en donde se encuentra el té verde, el cual es producido mediante un secado y una cocción de las hojas frescas al vapor para inactivar la PPO (mediante unos pequeños péptidos), que es la productora de la oxidación de las catequinas, y por lo tanto no se producirá dicha oxidación, 2) semifermetados como té oolong, el cual se produce cuando las hojas frescas son sometidas a una etapa de fermentación parcial antes de pasar a la etapa de secado, y 3) fermentados como el té negro y rojo, los cuales son sometidos a una etapa de fermentación después de la cosecha y antes del secado y la cocción al vapor (Cabrera *et al.*, 2006).

Un extracto de té verde (ETV) (figura 12) es una excelente fuente de polifenoles que son antioxidantes naturales, y aunque algunos de ellos pueden actuar como activadores, el hecho de que la PPO posea dos lugares en el centro activo indica que otros polifenoles pueden actuar como inhibidores de la PPO.



**Figura 12: Extracto de té verde**

Uno de los efectos beneficiosos más importantes del té verde es su actividad antioxidante, la cual se ha demostrado que un ETV posee mayor actividad que las soluciones de té negro, y la capacidad de captación de radicales libres de los compuestos polifenólicos (Benzie y Szeto, 1999).

En general se cree que entre los polifenoles, los flavonoides (figura 13) son los principales responsables de estas acciones (Wang *et al.*, 2000).

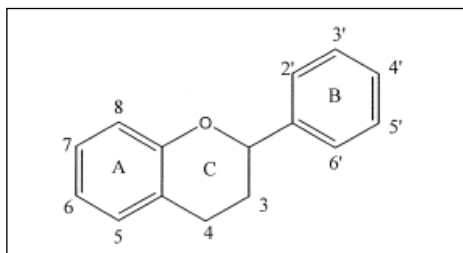


Figura 13: Estructura básica de los flavonoides (Wang *et al.*, 2000)

La mayoría de la actividad biológica del té parece estar relacionada con el contenido en flavonoides, como se ha dicho anteriormente. Las catequinas, las cuales son flavonoles, son el grupo mayoritario de flavonoides encontrados en el té.

Las principales catequinas en las hojas del té verde (*Camellia sinensis*) son (-)-epicatequina (EC), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG) y (-)-epigalocatequina galato (EGCG) (figura 14) (Erol, 2013; Friedman *et al.*, 2005). Las catequinas son eficaces secuestradores de radicales libres, además de actuar como quelantes de metales.

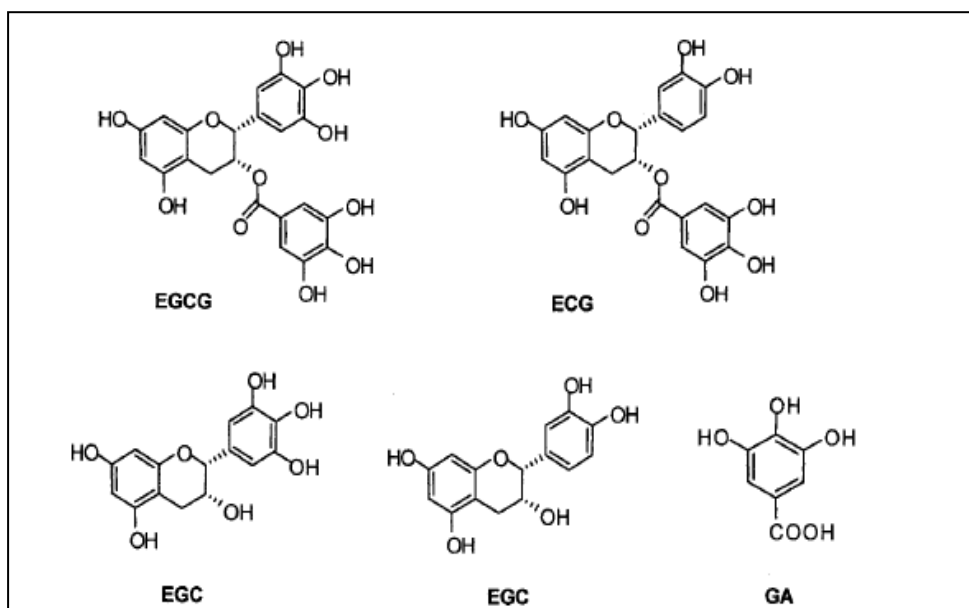


Figura 14: Estructura química del ácido gálico y las cuatro principales catequinas en el té verde (Cabrea, *et al.*, 2006)

Nirmal y Bejakul (2012) utilizaron ETV (0,1%) en combinación con el ácido ascórbico (0, 0,005 y 0,01 %) para retardar la melanosis (reacción de la PPO) en camarones almacenados 12 días.

El extracto al 0,1% de TV inhibió cerca de un 60,2% de la actividad de PPO del camarón blanco del Pacífico. Si éste se combina con 0,01% de ascórbico, se consigue un nivel de inhibición del 93%.

Además de conseguir con dicha combinación, la reducción de la melanosis en camarones, se obtienen puntuaciones superiores que la muestra control en las propiedades sensoriales.

Por lo tanto ETV en combinación con ácido ascórbico puede ser utilizado para tratar el camarón blanco del Pacífico con el fin de retardar la melanosis, así como para extender la vida útil de los camarones almacenados en hielo.

En otro estudio (Martín-Diana *et al.*, 2008) evaluaron el efecto sobre la calidad de lechuga recién cortada del ETV a tres concentraciones (0,25, 0,5 y 1 g/100 ml) a 20 y 50 °C.

El tratamiento de TV (0,25 g/100 ml a 20°C) y la aplicación de un tratamiento clorado (120 ppm a 20 °C) no muestran diferencias significativas para el pardeamiento y las propiedades sensoriales, aunque el ETV mantuvo mejor la actividad antioxidante de la lechuga que las muestras cloradas.

Por lo tanto este estudio permite concluir que el uso de un agente natural como es el ETV puede sustituir el uso de tratamientos con hipoclorito para mantener la calidad y conservar la lechuga mínimamente procesada.

El efecto antipardeante del ETV como un inhibidor natural de la PPO fue estudiado por Soysal (2009), en donde se utilizaron las medidas de color y la actividad enzimática para evaluar la efectividad del ETV sobre inhibición de la enzima y el pardeamiento en manzanas *Golden Delicious*.

Los ensayos también se realizaron con el fin de comparar el efecto del ETV con el ácido cítrico y ascórbico sobre la inhibición de la PPO, en donde se observó que la actividad de la enzima fue gradualmente decreciendo conforme se incrementaba la concentración de cualquiera de los compuestos.

El ácido ascórbico inhibió severamente a la polifenoloxidasasa incluso a bajas concentraciones. El ácido cítrico y el extracto de té verde también tuvieron un efecto significativo sobre su inhibición, donde la adición de 30 mg/ml de ETV inhibió a la PPO en aproximadamente un 42% como se puede observar en la tabla 5.

**Tabla 5: Actividad residual de la PPO en manzana *Golden Delicious* tratada con varios inhibidores (Soysal, 2009)**

Concentración (mg/ml)	% Actividad Residual de la PPO		
	Ácido ascórbico	Ácido cítrico	Extracto té verde
0	100	100	100
5	11,88 ± 0,028	94,72 ± 0,028	95,05 ± 0,072
15	0	53,45 ± 0,113	81,01 ± 0,042
30	0	34,25 ± 0,071	58,58 ± 0,268

Existen estudios (Bobo *et al.*, 2009) donde se observó que el ETV (0,25 g/100 ml) en patata cv *Monalisa* presentaba las menores variaciones de color a lo largo del almacenamiento (14 días/4 °C) en comparación con las combinaciones de 4-hexilresorcinol con ácido ascórbico y disulfito con ácido cítrico.

A partir de los estudios de Soysal (2009) y Bobo *et al.*, (2009) se planteó la posibilidad de combinar el extracto de té verde con ácidos orgánicos para evaluar la potencialidad de esta especia como antipardeante, ya que hasta el momento no se ha realizado ningún trabajo similar en patata mínimamente procesada.

## *2. OBJETIVOS*

## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo principal de este trabajo fin de máster es evaluar el efecto antipardeante y sobre la calidad de la patata mínimamente procesada (cv. *Monalisa*) de diferentes compuestos naturales como son: el extracto de té verde, el ácido ascórbico y el ácido cítrico, tanto individualmente como en combinación entre ellos.

Para alcanzar este objetivo, se han desarrollado diferentes objetivos específicos a lo largo del estudio, que han sido:

1. Evaluar el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO y la capacidad de inhibición del té verde.
2. Determinar las concentraciones de estudio de los ácidos orgánicos y analizar su capacidad antipardeante sobre la PPOp a nivel *in vitro*.
3. Seleccionar los tratamientos de té verde y ácidos orgánicos que hayan resultado interesantes a nivel *in vitro* y posteriormente evaluar dichos tratamientos seleccionados sobre el control del pardeamiento enzimático en patata mínimamente procesada a nivel *in vivo*.

### *3. MATERIAL, EQUIPOS Y MÉTODOS*



### 3. MATERIAL, EQUIPOS Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Material vegetal

Los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) cv. *Monalisa* utilizados para este estudio poseen un calibre entre 50-80 mm (figura 15).



Figura 15: Bolsa de patatas cv *Monalisa*

Estas patatas proceden de la región norte de España (Álava, País Vasco) corresponde a las campaña del 2013-2014. El cultivar *Monalisa* se caracteriza por presentar una forma ovalada, de piel amarilla y lisa, carne de color amarillo claro, ojos superficiales.

Durante el periodo de estudio de este proyecto, las patatas se almacenaron en cámaras frigoríficas a una temperatura de 8°C con una humedad relativa del 85% como sugieren Gunes y Lee (1997).

##### 3.1.2 Agentes conservantes: ácidos orgánicos

- ✓ Ácido cítrico anhídrido → PANREAC, Barcelona (E-330).
- ✓ Ácido L(+)-ascórbico → PANREAC, Barcelona (E-300).
- ✓ Disulfito sódico → PANREAC, Barcelona (E-223).

##### 3.1.3 Agente conservante natural: té verde

El té verde (*Thea sinensis Sims*) fue adquirido en bolsas comerciales (SoriaNatural, Soria). La bolsa contiene 70 gramos de hojas de té verde (figura 16).



Figura 16: Bolsa de té verde (SoriaNatural)

### **3.1.4 Reactivos**

El agua empleada para todos los ensayos realizados fue de naturaleza desionizada.

Para la extracción de la PPOp los reactivos utilizados fueron:

- ✓ Buffer McIlvaine (McIlvaine, 1921) → ácido cítrico 1-hidrato (E-330) y di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-hidrato (E-339ii) (PANREAC, Barcelona).
- ✓ Buffer fosfatos → Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-hidrato (E-339ii) y Sodio di-Hidrógeno Fosfato 1-hidrato (E-339i) (PANREAC, Barcelona).
- ✓ Cloruro sódico (PANREAC, Barcelona) y polivinilpirrolidona (PVPP) (Fluka, Steinheim, Alemania).
- ✓ Catecol, 1, 2-Dihidroxibenzol (SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim, Alemania).

Para la medida de la capacidad antioxidante por el método del radical DPPH, se utilizaron:

- ✓ DPPH. Radical 2, 2-Difenil-1-picrylhydrazyl (SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim, Alemania).
- ✓ Metanol (OPPAC, Noain, Navarra).

En la medida del contenido en polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu se necesitaron:

- ✓ Carbonato sódico (PANREAC, Barcelona).
- ✓ Reactivo fenólico Folin-Ciocalteu (SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim, Alemania).

Para el estudio del efecto de las soluciones antipardeantes en patata mínimamente procesada se hizo uso de hipoclorito de sodio para su desinfección.

### **3.1.5 Otros materiales**

- ✓ Material de vidrio como probetas, matraces, vasos de precipitados, etc., de plástico como tubos de plástico, puntas de pipeta, etc., y de metal como cuchillos, peladores, cucharillas, etc., para los diferentes análisis y para el procesado de las patatas en láminas.
- ✓ Papel filtro Whatman nº1,  $\varnothing=70\text{mm}$ , (Buckinghamshire, Reino Unido).
- ✓ Tela de quesería "Cheese-cloth" para separar las hojas de té de la fase acuosa.
- ✓ Cubeta de 1cm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
- ✓ Microplacas de 96 pocillos con capacidad de 200  $\mu\text{l}$  NUNC-F/bottom (Roskilde, Dinamarca).

En la figura 17 se pueden observar algunos de los materiales empleados.



**Figura 17: Papel Whatman nº1, tela de quesería y microplacas utilizadas en los ensayos**

## 3.2 Equipos

### 3.2.1 Extracción de la PPO

✓ Cámara frigorífica TARRE (Noain, Navarra, España), utilizada para el almacenamiento de la materia prima, con tablero de control, temperatura y humedad relativa (figura 18).



Figura 18: Cámara frigorífica TARRE (derecha) almacenamiento de la materia prima y Ultracongelador Vertical CLIMAS (izquierda) almacenamiento de la enzima PPO

✓ pH metro Basic 20 CRISON (Alella, Barcelona, España). Soluciones buffer pH 4.01 y 7.00 (figura 19).

✓ Batidora BOSH MSM6500/03 600W (Eslovenia) empleada para triturar la mezcla de los reactivos con la patata, tal y como se muestra en la figura 19.



Figura 19: pHmetro CRISON y batidora BOSH utilizadas en los ensayos

✓ Bomba de vacío VACUUBRAND ME2 NT (Wertheim, Alemania), como muestra la figura 20, utilizada para el filtrado.



Figura 20: Bomba de vacío VACUUBRAND para poder separar la parte sólida de la líquida

- ✓ Centrífuga SIGMA 3K30 (Osterode, Alemania) para poder separar la parte sólida de la líquida que haya podido quedar tras el filtrado a vacío (figura 21).



Figura 21: Centrífuga SIGMA utilizada para la separación de fases

- ✓ Ultracongelador Vertical CLIMAS nº2664 1000W (Barcelona, España), utilizado para mantener el extracto crudo de enzima congelado hasta su uso ( $-75 \pm 2$  °C) (figura 18).

### **3.2.2 Determinación de la actividad enzimática, porcentaje de inhibición y actividad antioxidante**

- ✓ Criotermostato de circulación JULABO F12-ED (Seelbach, Alemania) tiene aplicaciones de temperatura externa con operación simultánea de temperatura dentro de la cubeta de baño (figura 22).



Figura 22: Criotermostato de circulación utilizado para atemperar los extractos de PPOp

✓ Espectrofotómetro MULTISKAN GO UV/VIS Thermo Fisher Scientific Corp. (Waltham, Massachusetts, EE.UU), basado en un monocromador de alta calidad. En la figura 23 se puede observar el lecho multiplacas de dicho equipo. También se utilizó para medidas espectrofotométricas mediante cubetas.



Figura 23: Espectrofotómetro MULTISKAN con microplaca 96 pocillos

### **3.2.3 Caracterización de la patata**

✓ pH metro Basic 20 CRISON (Alella, Barcelona, España). Soluciones buffer pH 4.01 y 7.00

✓ Refractómetro portátil (figura 24) para determinación del contenido de sólidos solubles totales (°Brix) (north China Optical Instrument Mod. SZJ-A. Ocular: 3,4X; Rango de mediciones: 0-32%; Resolución 0,2%.

Para la determinación de materia seca:

✓ Balanza de precisión TP-214 DENVER INSTRUMENT (Goettingen, Alemania) (figura 24)

✓ Estufa de convección SELECTA modelo Digitronic (Abrera, Barcelona, España)

- ✓ Campana de desecación con silicagel como absorbente de humedad



Figura 24: Balanza de precisión y refractómetro portátil utilizados para la caracterización de la patata

### **3.2.4 Preparación del extracto de té verde**

- ✓ Baño para agua SELECTA Univeba 3000401(Abrera, Barcelona, España), para temperaturas regulables hasta  $200\pm 2$  °C. Este equipo será utilizado para realizar la infusión del extracto de té verde.

- ✓ Bomba de vacío VACUUBRAND ME2 NT (Wertheim, Alemania)

- ✓ Centrífuga SIGMA 3K30 (Osterode, Alemania)

### **3.2.5 Caracterización del té verde**

- ✓ Espectrofotómetro MULTISKAN GO UV/VIS Thermo Fisher Scientific Corp., (Waltham, Massachusetts, EE.UU).

- ✓ pH metro Basic 20 CRISON (Alella, Barcelona, España). Soluciones buffer pH 4.01 y 7.00.

### **3.2.6 Evaluación de las soluciones antipardeantes en patata mínimamente procesada**

- ✓ Cortadora industrial ROBOT-COUCPE CL 52 (Montceau Bourgogne, Francia) (figura 25).



Figura 25: Cortadora industrial ROBOT-COUCPE para lonchear las patatas

- ✓ Espectrofotómetro MINOLTA CM-2500d (Konica Minolta Sensing Inc.) empleando el espacio de color CIE  $L^*$   $a^*$   $b^*$  y como sistema de referencia el iluminante D65 /observador  $10^\circ$  (figura 26)
- ✓ Estufa de convección SELECTA modelo Digitronic (Abrera, Barcelona, España) (figura 26).



**Figura 26: Estufa de convección (izquierda) y espectrofotómetro (derecha) utilizados para el estudio del efecto de las soluciones antipardeantes sobre PMP**



### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Extracción de la enzima polifenoloxidasasa de patata (PPOp)

Está basado en el método descrito por Rojas-Graü *et al.*, (2008) con algunas modificaciones realizadas por Bobo (2014).

En primer lugar se homogeneizaron 25 gramos de patata cv. *Monalisa* con 50 ml de buffer Mcllvaine a pH 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 7,5 con NaCl 1 M (PANREAC, Barcelona, España) y 5% polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Fluka, Steinheim, Alemania) con una batidora (Bosch 600 W Eslovenia) a máxima velocidad durante 2 minutos en frío (4 °C) para evitar el pardeamiento.

Se filtraron mediante la bomba a vacío (Vacuubrand ME2 NT Wertheim, Alemania), con papel de filtro (Whatman nº1, Buckinghamshire, Reino Unido) siempre dentro de un baño de agua-hielo (4 °C). Seguidamente se pasó a centrifugar el filtrado (Centrífuga Sigma 3K30 Osterode, Alemania) a 25.500 xg durante 20 min a 4 °C.

Posteriormente se guardó el sobrenadante, que fue usado como el extracto crudo de enzima (PPOp), con un barrido con N<sub>2</sub> para eliminar el O<sub>2</sub> existente que puede dar lugar a una oxidación y pasó a ser congelado en el ultracongelador (Vertical CLIMAS, Barcelona) a -75 ± 2 °C hasta su uso posterior. La extracción de la enzima se hizo por duplicado. La apariencia del extracto crudo y congelado de la enzima PPOp se observan en la figura 27.

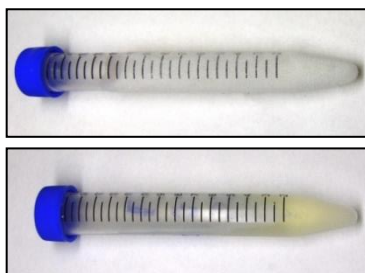


Figura 27: Extracto de enzima PPOp crudo (abajo) y congelada (arriba)

#### 3.3.2 Determinación en cubetas de la actividad enzimática

Está basado en el método descrito por Rojas-Grau *et al.*, (2008) con alguna modificaciones realizadas por Bobo (2014).

En una cubeta de 1cm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) se añadieron 3 ml de catecol 50 mM al que se le incorporaron 0,075 ml de extracto crudo de enzima PPOp a

diferentes pHs (4,5-7,5). El catecol debe de prepararse al mismo pH al que se encuentra la enzima.

En el espectrofotómetro Scientific MULTISKAN GO (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU) se midió la cinética de la reacción a 25 °C durante 2 minutos cada 5 s a una longitud de onda de 400 nm. Como blanco de la reacción se utilizó buffer McIlvaine a cada pH específico (4,5- 7,5).

Una unidad de actividad de PPOp está definida como el cambio de la absorbancia en 0,001 por minuto y mililitro inmediatamente después de la adición del extracto de enzima. El ratio de la reacción inicial se estima a partir de la primera región lineal de la curva (Kahn, 1977).

La ecuación seguida para el cálculo de la actividad enzimática es:

$$UA/min \cdot ml = \left( \frac{Abs_f - Abs_i}{0,001} \right) / (Y * 0,075)$$

Dónde:

- Abs<sub>f</sub>: absorbancia final para el tiempo Y de la reacción
- Abs<sub>i</sub>: absorbancia inicial de la reacción
- Y: tiempo (minutos) en el que finaliza la zona lineal de la curva

Para cada pH y extracto de enzima se repitieron las medidas 5 veces, es decir existen 10 medidas de actividad enzimática ya que como se vio en el apartado anterior se realizaron dos extracciones de la PPO.

### **3.3.3 Determinación en microplacas de la inhibición de la PPO empleando soluciones antipardeantes**

El desarrollo de este método se realiza en base al descrito por Masuda *et al.*, (2005) con diversas modificaciones realizadas por Bobo (2014).

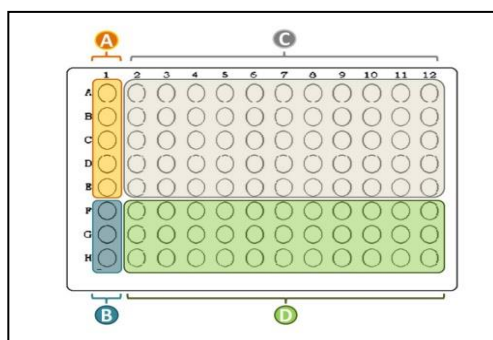
Este método evalúa el desarrollo de la reacción enzimática en presencia y ausencia de un inhibidor mediante medidas espectrofotométricas con el lector multiplacas Scientific MULTISKAN GO ((ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU).

Al utilizar multiplacas de 96 pocillos se permite realizar gran cantidad y diversas mediciones al mismo tiempo, en comparación con la medida en cubeta, lo que se traduce en un ahorro de tiempo y coste.

En una microplaca (96 pocillos F/bottom; NUNC, Roskilde, Dinamarca) se añadieron los reactivos y las cantidades correspondientes para cada pocillo como muestra la tabla 6 y su distribución en la figura 28. Tanto el catecol, como el buffer y la enzima, se encontraban en el mismo pH para cada tratamiento (4,5-7,5).

**Tabla 6: Distribución de los diferentes reactivos en microplaca**

Denominación	Buffer McIlvaine o Fosfatos ( $\mu$ l)	Inhibidor ( $\mu$ l)	Enzima ( $\mu$ l)	Catecol ( $\mu$ l)
A	120	0	40	40
B	160	0	0	40
C	80	40	40	40
D	120	40	0	40



**Figura 28: Distribución de los diferentes componentes en la microplaca para la medición de la capacidad de inhibición**

Primero se añadió la cantidad de buffer especificada en la tabla 6 al pH correspondiente, seguidamente el inhibidor y posteriormente la enzima diluida (1:9 v/v). Se introdujo la microplaca en el espectrofotómetro y se agitó durante 5 minutos a 25 °C a velocidad media y continua y se pasó a incubar otros 5 minutos a la misma temperatura. Por último se agregó el catecol 200 mM (SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim, Alemania) se agitó durante 5 minutos, se revió la existencia de burbujas y se introdujo de nuevo la placa a incubar 5 minutos a 25 °C.

Se pasó a medir a una longitud de onda de 420 nm a 25 °C en el espectrofotómetro multiplicas Scientific MULTISKAN GO (ThermoFisher Scientific,

Waltham, Massachusetts, EE.UU). Para determinar la capacidad de inhibición del compuesto inhibidor de la PPOp (%IPPO) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición PPOp} = \left[ \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \right] * 100$$

Dónde:

- A: corresponde a la absorbancia obtenida por la reacción de la PPOp sin la presencia del inhibidor.
- B: es el blanco de la medida de A.
- C: corresponde a la absorbancia obtenida por la reacción de PPOp en presencia del inhibidor a estudiar.
- D: es el blanco de las medidas de C.

En esta primera determinación de la capacidad de inhibición de la PPO el buffer utilizado fue McIlvaine y el inhibidor fue extracto de té verde (ETV). El ensayo se realizó por duplicado para cada pH.

Una vez evaluada la actividad enzimática y la capacidad de inhibición del té verde en el rango de pH establecido, se determinó cuál es el pH óptimo en donde se produce la máxima actividad de la enzima y la máxima inhibición.

El siguiente análisis fue analizar la capacidad antipardeante de las soluciones de té verde con ácidos orgánicos sobre la inhibición de la PPOp siguiendo el mismo método, pero en lugar de usar buffer McIlvaine se pasó a utilizar buffer fosfatos al pH óptimo seleccionado. La medición del porcentaje de inhibición se realizó por duplicado para cada tratamiento.

El objetivo de esta determinación fue observar la potencialidad antipardeante de la combinación de TV+AC y TV+AA a diferentes concentraciones, analizar la existencia de sinergismos entre ellos y comparar las medidas aparecidas con los resultados obtenidos para los tratamientos en solitario de TV, disulfito (DS+AC) y los ácidos orgánicos a las mismas concentraciones.

### **3.3.4 Caracterización de la materia vegetal y de las soluciones antipardeantes**

#### **3.3.4.1 Caracterización de la patata**

Las patatas cv *Monalisa* utilizadas para la realización de este estudio fueron caracterizadas mediante tres parámetros: pH, contenido en humedad y contenido en sólidos solubles. Las medidas se realizaron con tres lotes de patata y por triplicado.

#### **pH**

Para la medida del pH se trituraron 100 g de patata y se pasó a medir con el pHmetro CRISON. Las medidas se realizaron por triplicado de acuerdo a los métodos oficiales AOAC 981.12 (AOAC, 2000).

#### **CONTENIDO EN HUMEDAD**

El contenido en humedad fue determinado en muestras de aproximadamente 3 g para cada lote, una adaptación de los métodos oficiales AOAC 930.15 (AOAC, 2000).

Los 3 g de peso fresco de patata se depositaron en bandejas desechables de aluminio, que se secaron en estufa de convección (J. P. SELECTA, España) a 105 °C hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 24 horas). Las determinaciones gravimétricas se realizaron empleando una báscula de precisión TP-214 DENVER INSTRUMENT efectuando tres medidas por cada lote.

El contenido de humedad de las muestras (%H) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$H = \frac{P_i - P_f}{P_i - P_b} \times 100$$

Dónde:

- $P_i \rightarrow$  peso inicial (g),  $P_i = P_b + m_f$
- $P_f \rightarrow$  peso final (g),  $P_f = P_b + m_s$
- $P_b \rightarrow$  peso de la bandeja (g)
- $m_f \rightarrow$  peso de la muestra fresca (g)
- $m_s \rightarrow$  peso de la muestra seca (g)

## **CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES**

Para la determinación del contenido de sólidos solubles totales (SST) se trituraron 100 g de muestra hasta dejarla reducida a jugo. Se tomaron un par de gotas de dicho jugo y se depositaron en la ventana de medición del refractómetro portátil (North China Optical Instruments Factory, Mod. SZJ-A) para la determinación del contenido de azúcares solubles ( $^{\circ}$ Brix) previamente calibrado.

La concentración de sacarosa se expresa con los  $^{\circ}$ Brix a una temperatura de 20  $^{\circ}$ C. El  $^{\circ}$ Brix es equivalente al porcentaje de peso de la sacarosa contenida en una solución acuosa. Si a 20  $^{\circ}$ C una solución tiene 30  $^{\circ}$ Brix, significa que la solución tiene un 30% de sacarosa.

Todas las determinaciones se presentaron como la media de los tres lotes junto con su desviación estándar.

### **3.3.4.2 Caracterización del extracto de té verde**

Para obtener el extracto de té verde, las condiciones generales de extracción están basadas en Essa *et al.*, (2004), en donde se depositaron 10 g de hojas de té verde (SoriaNatural) en un vaso de precipitados y se añadieron 60 ml de agua destilada durante 7 minutos a una temperatura de  $55 \pm 1$   $^{\circ}$ C en el baño de agua SELECTA (Abrera, Barcelona, España).

Pasado ese tiempo las hojas de té verde se escurrieron en una tela de quesería para separarlas de la fase acuosa y posteriormente se pasó a un filtrado a vacío mediante la bomba VACUUBRAND ME2 NT (Wertheim, Alemania) en papel de filtrado Whatman nº1 (Buckinghamshire, Reino Unido).

Por último se llevó al extracto crudo de té verde a la centrifuga SIGMA 3K30 (Osterode, Alemania) a 8000 xg durante 20 minutos a 4  $^{\circ}$ C.

Para la medida del pH, se depositó el extracto de té verde en un vaso de precipitados y se pasó a medir con el pH-metro CRISON. La medida se realizó por triplicado.

La determinación del contenido en polifenoles totales y la actividad antioxidante del extracto de té verde se describe a continuación.

#### 3.3.4.3 Determinación de la actividad antioxidante de los tratamientos seleccionados

La metodología de la medida de la actividad antioxidante de los tratamientos seleccionados se basó en el ensayo en microplacas de 96 pocillos descrito por Bobo-García *et al.*, (2014).

A 20  $\mu\text{l}$  de la muestra diluida se le añadieron 180  $\mu\text{l}$  de solución DPPH (150  $\mu\text{mol/l}^1$ ) en metanol-agua (80:20, v/v) y se pasó a agitar durante 60 segundos en una microplaca de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca).

Después se colocó la microplaca en la oscuridad durante 40 minutos a temperatura ambiente, y pasado ese tiempo se midió la absorbancia a 515 nm en el lector de microplacas del espectrofotómetro Thermo Scientific MULTISKAN GO (ThermoFisher Scientific).

Para generar la curva de calibración que aparece en la figura 29, Trolox fue utilizado como estándar en 50- 500  $\mu\text{l/l}$ .

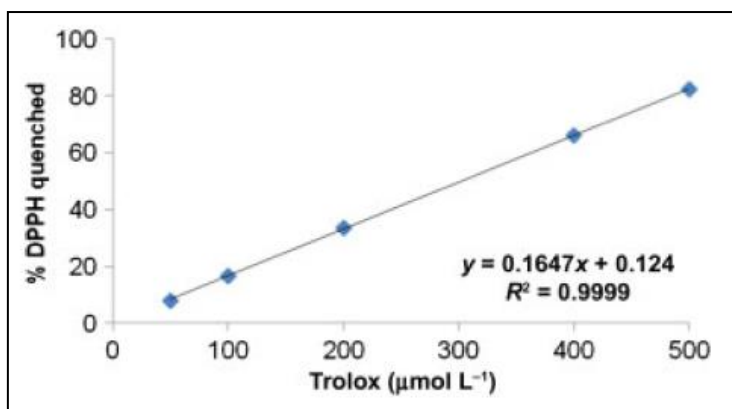


Figura 29: Curva estándar para ensayos en microplacas sobre la actividad antioxidante (DPPH)

#### 3.3.4.4 Determinación del contenido en polifenoles totales de los tratamientos seleccionados

La metodología de la medida del contenido polifenólico de los tratamientos seleccionados se basó en el ensayo en microplacas de 96 pocillos descrito por Bobo-García *et al.*, 2014.

A 20  $\mu\text{l}$  de muestra diluida se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  de reactivo Folin-Ciocalteu (1:4, v/v) y se agitaron durante 60 segundos en una microplaca de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca).

La mezcla se dejó durante 4 minutos y seguidamente se añadieron 75  $\mu\text{l}$  de solución de carbonato sódico (100 g/l) y se agitó a velocidad media y continua durante 1 minuto.

Después de 2 horas a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 750 nm usando el lector multiplacas del espectrofotómetro Thermo Scientific MULTISKAN GO (ThermoFisher Scientific).

La absorbancia de la misma reacción con agua en lugar de muestra fue restada de la absorbancia de la reacción con la muestra.

Para generar la curva de calibración que aparece en la figura 30, las diluciones de ácido gálico (10-200 mg/l) fueron utilizadas como estándar.

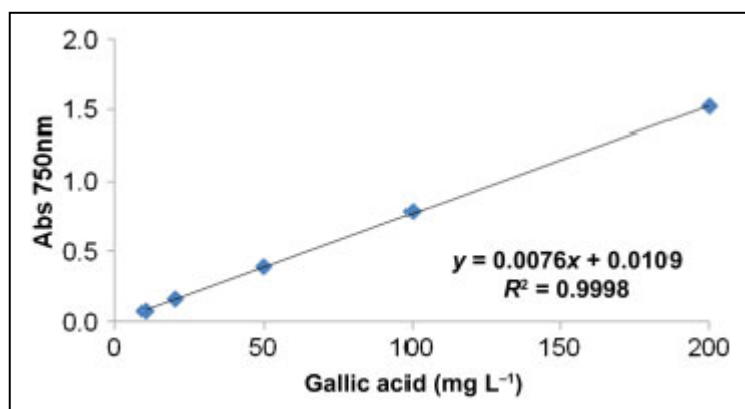


Figura 30: Curva estándar para ensayos en microplacas sobre el contenido polifenólico total (Folin-Ciocalteu)

### **3.3.5 Efecto de las soluciones antipardeantes sobre patata mínimamente procesada**

#### **3.3.5.1 Procesado mínimo de las patatas**

El diagrama de flujo para la elaboración de patatas mínimamente procesadas y sus posteriores análisis a realizar se observa en la figura 31.



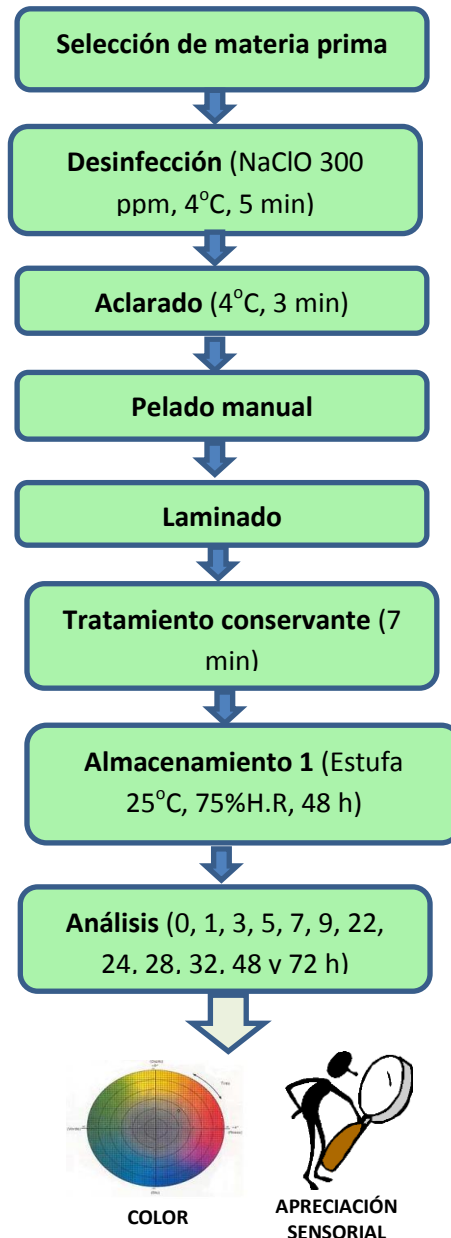


Figura 31: Diagrama de flujo del procesado mínimo de patatas y posteriores análisis

Para el procesado mínimo los tubérculos se desinfectaron en hipoclorito de sodio, (NaClO, 300 ppm) como sugiere Ma *et al.*, (2010) durante 5 minutos, se aclararon durante 3 min (figura 32), se pelaron a mano ya que diferentes estudios han comprobado que este método minimiza los daños producidos al tejido (Gunes y Lee, 1997) y se cortaron en lonchas de 5 mm de espesor (figura 32) usando una cortadora industrial ROBOT-COUBE CL 52 (Montceau Bourgogne, Francia).

La porción utilizada para la realización de todos los lavados fue de 3 litros de agua por cada kilogramo de producto (Laurila *et al.*, 1998).

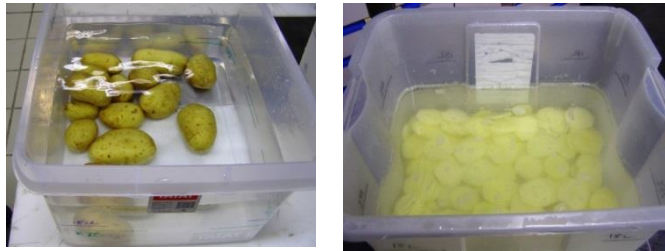


Figura 32: Aclarado (izquierda) y loncheado de las patatas (derecha)

Las lonchas se mantuvieron sumergidas en agua desionizada hasta su tratamiento, para eliminar el exceso de almidón y otros componentes celulares, evitar la oxidación y mantener la temperatura.

Una vez cortadas las patatas, se escurrieron las láminas y éstas fueron sumergidas en la solución antipardeante correspondiente durante 7 min a 4 °C. El tratamiento control consistió en patatas mínimamente procesadas a las que no se les aplicó ningún tratamiento antipardeante. Las soluciones antipardeantes fueron preparadas por triplicado como muestra la figura 33.

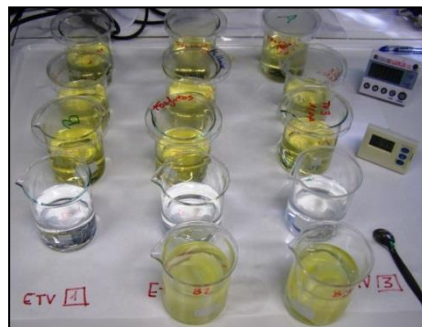


Figura 33: Soluciones antipardeantes (incluido el control) aplicadas a las lonchas de patata cv. *Monalisa*

Las lonchas de patata fueron almacenadas en dos estufas iguales, de convección, SELECTA modelo Digitronic (Abrera, Barcelona, España) a  $25 \pm 1$  °C con una humedad relativa del 75% durante 48 horas (figura 34).



Figura 34: Almacenamiento de las lonchas de patata en estufa de convección a  $25\pm 1$  °C y 75%H.R durante 48 horas

### 3.3.5.2 Evaluación de la eficacia de las soluciones antipardeantes sobre el color y las apreciaciones sensoriales en PMP

#### COLOR

La determinación del color superficial de las lonchas de patata se llevó a cabo de forma instrumental a diferentes horas: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 22, 24, 28, 32, 48. Se empleó un espectrofotómetro Minolta CM-2500d (Konica Minolta Sensing Inc.) utilizando el espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$  y como sistema de referencia el iluminante 65/ observador 10°. Previamente a cada medición el instrumento era calibrado.

En este modelo de medición del color,  $L^*$  es la luminosidad que establece el grado de claridad de la muestra. Los valores positivos son colores claros y los negativos indican colores oscuros.

Los valores de las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  definen el plano de cromaticidad en el que valores positivos de  $a^*$  indican colores rojizos y los negativos colores hacia el verde. En el caso de  $b^*$ , los valores positivos tienden al color amarillo y los valores negativos indican color azul (figura 35).

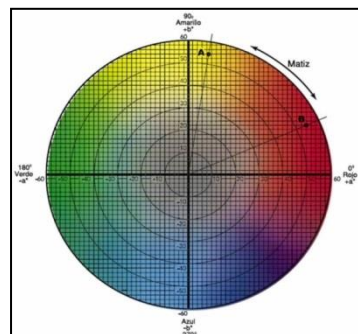


Figura 35: Sistema CIE  $L^* a^* b^*$

Como medida de cada parámetro se tomó el promedio de tres disparos aleatorios realizados sobre la superficie de cada loncha.

Para este ensayo se realizaron 15 mediciones por cada tratamiento (5 lonchas x 3 disparos) y cada tratamiento se encontraba por triplicado, haciendo un total de n=45 mediciones para cada tratamiento y hora.

### **APRECIACIONES SENSORIALES**

Las apreciaciones sensoriales fueron recogidas a lo largo del tiempo de análisis para cada tratamiento, donde se evaluó:

- Apariencia → el objetivo de su evaluación fue valorar el atributo del color, sobre todo en la percepción del pardeamiento, pero también se observó si la muestra había presentado cambios a lo largo del almacenamiento con la aparición sequedad superficial, depósitos marcados de fibras de almidón, exudados, etc.
- Olor → el principal objetivo de su evaluación fue comprobar si las muestras presentaban algún cambio indicativo de descomposición o fermentación.
- Textura → se comprobaron los cambios producidos sobre la firmeza de la patata durante el almacenamiento. Para ello fue necesario flexionar y presionar para poder comprobar su textura.

Todos estos parámetros fueron evaluados con puntuaciones de 0 a 3, donde cada número corresponde a un estado diferente de las lonchas de patata como muestra la tabla 7.

**Tabla 7: Puntuaciones para evaluar las apreciaciones sensoriales observadas durante el almacenamiento de la PMP**

	Puntuación	Significado
<b>COLOR</b>	<b>0</b>	Ningún cambio de color apreciable
	<b>1</b>	Ligero cambio en el color
	<b>2</b>	Aparición de coloraciones pardeadas (áreas puntuales o extendidas)
	<b>3</b>	Cambio severo hacia coloraciones pardas o similares
<b>OLOR</b>	<b>0</b>	Ningún cambio en el olor apreciable
	<b>1</b>	Ligero cambio en el olor
	<b>2</b>	Olores extraños e indeseables
	<b>3</b>	Olores totalmente indeseables
<b>SEQUEDAD SUPERFICIAL</b>	<b>0</b>	Superficie húmeda similar a recién procesada
	<b>1</b>	Aspecto seco ligero
	<b>2</b>	Sequedad superficial marcada
	<b>3</b>	Sequedad superficial severa
<b>TEXTURA</b>	<b>0</b>	Buena textura similar a recién procesada
	<b>1</b>	Cambio ligero en la textura
	<b>2</b>	Pérdida de turgencia moderada
	<b>3</b>	Grandes cambios de textura, excesivamente blandas

### **3.3.6 Análisis estadístico**

Los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 21.0 para Windows. En el caso de diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $\alpha=0,05$ ), se realizaba la comparación mediante el Test de Tukey.

## *4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO y la capacidad de inhibición del té verde

El rango de pH seleccionado fue de 4,5 a 7,5 con incrementos de 0,5 unidades. Este rango se seleccionó porque en estudios preliminares se observó que para pHs inferiores a 4,5 la actividad de la enzima PPO en patata cv. *Monalisa* (PPOp) era prácticamente nula y la capacidad inhibitoria del ETV daba resultados negativos, ya que la absorbancia obtenida por la reacción de PPOp en presencia del inhibidor (té verde), era superior a la reacción de ésta sin la presencia del extracto, es decir, que la coloración de la reacción era debida únicamente al té verde.

Para la determinación de la actividad enzimática y la capacidad de inhibición del ETV, se emplearon dos extractos crudos de enzima PPOp pertenecientes a dos lotes diferentes de patatas que no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre sí.

#### 4.1.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO de patata cv. *Monalisa*

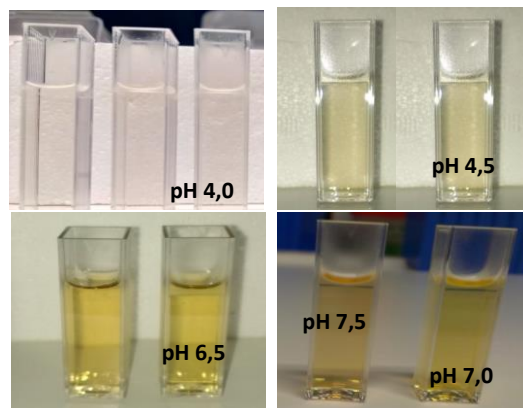
En la tabla 8 se pueden observar los valores de actividad enzimática de la determinación en cubetas de la polifenoloxidasa de patata cv. *Monalisa* en presencia del sustrato catecol en función del pH.

Tabla 8: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPOp

pH	Actividad Enzimática (UA/ml·min)
4,5	618,21 ± 35,83*
5,0	819,45 ± 43,32
5,5	1395,72 ± 69,68
6,0	1683,82 ± 86,48
<b>6,5</b>	<b>3892,43 ± 225,20</b>
7,0	3481,86 ± 169,28
7,5	2686,35 ± 176,35

\*media ± desviación estándar

Los valores mostrados en la tabla 8 son apoyados por las fotografías presentadas en la figura 36 en donde se pueden observar diferentes coloraciones aparecidas en las cubetas en función del pH una vez finalizada la medición en el espectrofotómetro.



**Figura 36:** Coloraciones de las cubetas tras la medición de la actividad de la PPO a diferentes pH

En la tabla 8 se observa que conforme aumentaba el valor de pH también lo hace la actividad enzimática hasta el valor de 6,5, momento en el que se produjo la mayor actividad de la enzima, que está definida como el número de moles de sustrato que reaccionan para formar producto por mol de enzima y por unidad de tiempo.

Se puede observar en la figura 36 que la cubeta para dicho pH, presentaba una coloración amarillenta muy viva, ya que este es el pH donde se produce la actividad óptima de la enzima, es decir, donde se encuentra completamente saturada de sustrato y está dando lugar a productos de la reacción a la máxima velocidad.

Diferentes autores han estudiado a qué pH la cinética de la polifenoloxidasas tiene su actividad óptima, indicando que en la mayoría de frutas y hortalizas a 25 °C, se encuentra entre 5-7 (Parzanese, 2010; Hernández, 2009).

En patata, Lin *et al.*, (2010); Eihhin *et al.*, (2010); Duangmal y Apenten (1999); Cho y Ahn (1998) establecieron que los valores óptimos están pH entre 6,0-7,5 para la máxima actividad de la PPO, y más concretamente, Trujillo *et al.*, (2013) indicaron que las variedades *Pastusa Suprema* e *ICA Única* tiene su máxima actividad a pH 6,5, mientras que el pH óptimo para *Parda pastusa* es de 7,0, estando *Monalisa* (cultivar de este estudio) en pH 6,5.

A partir de dicho valor, la velocidad la reacción comenzó a descender y por lo tanto la actividad de la PPOp (pH 7 y 7,5).

Por último de la figura 36 sería destacable comentar la cubeta correspondiente a pH 4,0 que presentó una coloración transparente signo de no haberse producido la



reacción en las condiciones establecidas de ensayo. Puede ser debido a que el pH fue demasiado bajo y comenzó a afectar a la estructura de la enzima y por lo tanto a su actividad, de ahí la elección del rango de pH establecido.

#### 4.1.2 Efecto del pH sobre la capacidad de inhibición del té verde en la PPO patata cv. *Monalisa*

Lo primero que se realizó fue la caracterización del ETV cuyo parámetro físico estudiado fue el pH, el cual fue medido por triplicado en cada uno de los lotes, cuyo valor promedio del conjunto de los tres lotes fue de  $5,25 \pm 0,02$  en donde no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Seguidamente se realizaron ensayos preliminares para ajustar el método y poder medir los diferentes pHs.

El rango establecido de pH para evaluar la capacidad de inhibición del ETV (%IPPO) a una concentración del 5% fue entre 4,5 y 7,5. Los resultados se muestran en la tabla 9:

**Tabla 9: Determinación de la capacidad del extracto de té verde para inhibir la enzima PPOp**

pH	%IPPOp
4,5	$18,84 \pm 3,50^*$
5,0	$48,13 \pm 3,25$
5,5	$59,85 \pm 1,81$
6,0	$64,77 \pm 2,93$
<b>6,5</b>	<b><math>67,04 \pm 1,73</math></b>
7,0	$60,07 \pm 2,85$
7,5	**n.c

\*media  $\pm$  desviación estándar

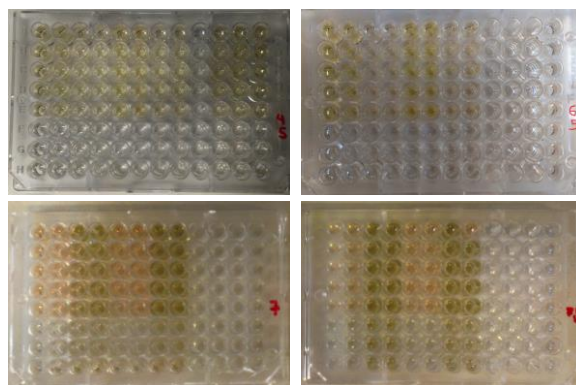
\*\*n.c: no cuantificable

En la tabla 9 cabe destacar que la capacidad de inhibición del ETV pareció seguir la misma evolución que la actividad enzimática de la PPOp, es decir, cuanto menor es el pH, menor es su actividad y menor es la capacidad su capacidad para inhibir la enzima, pero conforme aumentaba este parámetro, se iba consiguiendo una mayor inhibición al igual que una mayor actividad.

Este resultado pudo ser debido a que un aumento de pH hasta llegar al óptimo, fue saturando la enzima de sustrato, dando lugar a productos de la reacción cada vez más rápido, hasta llegar al pH óptimo de 6,5 donde la reacción tuvo lugar a la máxima velocidad, es decir, la polifenoloxidasas se encontraba completamente saturada pudiéndose inhibir más su reacción y el potencial inhibidor del extracto de té verde fue más efectivo a este pH ya que la actividad que debe inhibir fue máxima en las condiciones establecidas.

Soysal, (2009), investigó el efecto del ETV en la inhibición de la PPO en manzana *Golden Delicious*, donde consiguió unos resultados de %IPPO a pH 5,5 del 42% *in vitro* utilizando una concentración de 30 mg especia/ml solución. En este caso, el ETV al 5% que sería una concentración de  $14,0 \pm 0,6$  mg especia/ml solución, para el mismo pH, es decir 5,5, inhibiría a la PPO de patata cv. *Monalisa* en un 59,85%, aunque estos resultados no podrían compararse ya que a pesar de tratarse de la misma enzima, provienen de productos diferentes y por lo tanto podrían comportarse de diferente forma.

De una manera más ilustrativa, los resultados obtenidos empíricamente con las medidas espectrofotométricas pueden compararse con las fotografías tomadas a las microplacas (figura 37) una vez realizada la medición, en donde se puede observar como las coloraciones iban cambiando conforme varía el pH.



**Figura 37: Coloraciones producidas por la reacción entre la enzima, el sustrato y el inhibidor para pH 4,5 (arriba-izquierda), 6,5 (arriba-derecha), 7 (abajo-izquierda) y 7,5 (abajo-izquierda)**

Las coloraciones tan oscuras para pH 7 y 7,5 son debidas, además de la coloración de la propia enzima, al catecol que se iba oscureciendo (figura 38) conforme

aumentaba el pH, haciendo que el conjunto enzima + inhibidor + sustrato, tuviese una absorbancia mucho mayor que el conjunto enzima + sustrato, y por lo tanto diese como resultado porcentajes de inhibición negativos, como justifican los resultados obtenidos empíricamente en la tabla 9.



Figura 38: Evolución del color en el sustrato catecol conforme aumenta el pH

Por lo tanto, con todos estos resultados se concluyó que para los siguientes ensayos era necesario trabajar con la enzima, el sustrato y el buffer a pH 6,5, en donde se producía la máxima actividad de ésta y se conseguía la máxima capacidad de inhibición.

A partir del pH óptimo se cambió el buffer McIlvaine por un buffer de Fosfatos, ya que el tampón utilizado hasta el momento contenía ácido cítrico y éste va a ser usado como agente antipardeante para la inhibición de la PPO por lo que la concentración de ácido cítrico final variaría y con él el pH.

Se realizó la extracción de la enzima a pH óptimo (6,5) con buffer fosfato (Rojas-Grau *et al.*, 2008; Cantos *et al.*, 2002., Carbonaro *et al.*, 2002., Mosneaguta *et al.*, 2012., Soysal, 2009) como sigue el apartado 3.3.1 y se comprobó que la actividad enzimática es la misma para ambos buffers a pH 6,5 (tabla 10). Lo que era de esperar ya que el pH de trabajo es el mismo.

La extracción de la enzima, al igual que la medida de la actividad enzimática, se realizó por duplicado.

Tabla 10: Actividad enzimática a pH 6,5 utilizando diferentes buffers

Buffer utilizado pH 6,5	Actividad Enzimática (UA/ml·min)
Mcllvaine (ácido cítrico 1-hidrato y di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-hidrato)	3892,43 ± 225,20*
Fosfatos (Di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-hidrato y Sodio di-Hidrógeno Fosfato 1-hidrato)	3899,27 ± 388,51

\*media ± desviación estándar

Con todas las medidas obtenidas de absorbancia con el espectrofotómetro se observó que no existían diferencias significativas entre las extracciones de enzima ni entre las actividades de la misma con los distintos buffers ( $p > 0,05$ ).

Por lo tanto, para los ensayos posteriores *in vitro* con los agentes antipardeantes a estudiar, los componentes de la reacción de pardeamiento enzimático (enzima, buffer y catecol) se realizaron a pH 6,5 y con buffer de fosfatos.

## **4.2 Descripción de las condiciones de estudio en la inhibición de la PPOp**

### **4.2.1 Selección de concentraciones de los ácidos orgánicos**

El estudio de diferentes tratamientos antipardeantes, los cuales poseen diferentes naturalezas, pueden producir cambios en el pH de los ensayos *in vitro*, lo cual forma parte de su acción inhibidora, como es el caso de los ácidos orgánicos.

Por ello se estableció un rango de pHs en los cuales se evaluó el efecto de los compuestos antipardeantes. El rango fue desde 6,5 (actividad óptima de la enzima) hasta valores de 4,5 aproximadamente, que es donde se observó que se comienza a producir inhibición de la enzima como se ha podido observar en la el apartado 4.1.2.

Para la determinación de las concentraciones de los ácidos se midió el pH final de la reacción enzimática en las condiciones establecidas para el ensayo de microplacas. Los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluó el pH que se obtenía al aumentar en 0,1% la concentración del AC o AA hasta alcanzar un pH lo más próximo a 4,5.

Para el caso del té verde, la concentración fue siempre de 5%, ya que estudios precedentes (Bobo, 2014) indicaron que un aumento de la concentración no implicaba un aumento del porcentaje de inhibición.

Las concentraciones seleccionadas de los agentes antipardeantes individuales y los valores de pH finales en cada reacción aparecen en la tabla 11.

**Tabla 11: pH de la solución final a diferentes concentraciones de agentes antipardeantes**

<b>Agente antipardeante</b>	<b>Concentración (%)</b>	<b>pH reacción final</b>
<b>Ácido cítrico</b>	0,5	6,10 ± 0,01*
	1,0	5,65 ± 0,00
	2,0	4,64 ± 0,00
	2,5	4,15 ± 0,01
<b>Ácido ascórbico</b>	0,5	6,44 ± 0,03
	1,5	6,17 ± 0,01
	2,5	5,72 ± 0,01
	5,0	4,27 ± 0,01
<b>Té verde</b>	5,0	6,50 ± 0,00

\*media ± desviación estándar

Como se puede observar en la tabla 11, la adición de té verde no implicó variación alguna del pH de la solución, es decir, para el caso de la inhibición de la PPOp utilizando únicamente ETV al 5% el pH no se ve modificado por extracto, lo que indica que su mecanismo de acción para la inhibición no es mediante un cambio de pH.

En esta misma tabla destaca el gran poder acidulante del ácido cítrico que con una concentración inicial del 0,5% la bajada de pH fue de hasta 4 décimas más en comparación con el ascórbico, es decir, es necesaria mucha menos cantidad de ácido cítrico que de ascórbico para alcanzar un pH inferior.

Ya que el objetivo final es evaluar la capacidad de inhibición del ETV combinado con ácidos orgánicos, también se midió el pH final de dichas combinaciones, como se muestra en la tabla 12, para observar cómo se comporta el pH de la reacción en esas condiciones.

**Tabla 12: pH de la solución final resultante de la combinación de té verde con ácidos orgánicos**

TÉ VERDE + ÁCIDO CÍTRICO		TÉ VERDE + ÁCIDO ASCÓRBICO	
Concentración solución (%)	pH	Concentración solución (%)	pH
TV 5% + 0,5% AC	6,03 ± 0,01*	TV 5% + 0,5% AA	6,34 ± 0,01
TV 5% + 1% AC	5,62 ± 0,01	TV 5% + 1,5% AA	6,08 ± 0,00
TV 5% + 2% AC	4,20 ± 0,01	TV 5% + 2,5% AA	5,67 ± 0,01
TV 5% + 2,5% AC	3,81 ± 0,00	TV 5% + 5% AA	4,27 ± 0,00

\*media ± desviación estándar

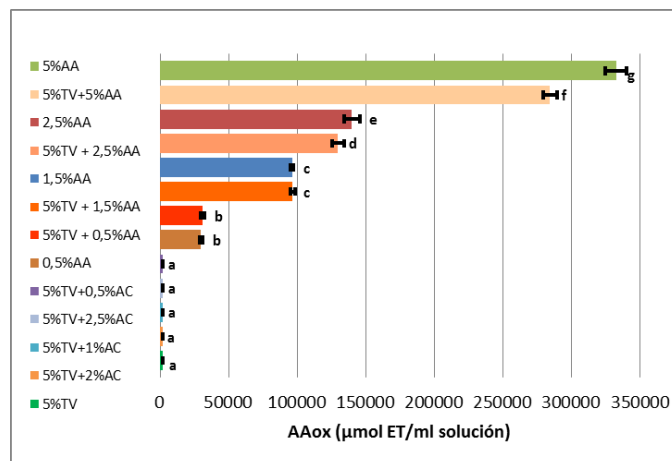
Se puede observar en la tabla anterior que los pH de las combinaciones (ETV con ácidos orgánicos) como agentes antipardeantes fueron similares a los valores obtenidos cuando estos se encontraban en solitario. Esto indicaría que el té verde prácticamente no influye en dicha acidificación, produciéndose únicamente por el carácter acidulante de los ácidos orgánicos.

#### **4.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante y el contenido total en fenoles de las soluciones antipardeantes**

Se determinó el contenido en fenoles totales y la actividad antioxidante (AAox) del extracto del extracto de té verde y la combinación de éste con los ácidos orgánicos correspondientes.

#### 4.2.2.1 Actividad antioxidante de las soluciones antipardeantes

Los resultados de la AAox se muestran en la figura 39, donde cada tratamiento se analizó por triplicado.



**Figura 39:** Actividad antioxidante (μmoles de equivalentes de Trolox/l solución) de cada tratamiento

La máxima actividad antioxidante obtenida fue 5%AA (332565,62±7694,58 μmol ET/ml) como era de esperar, y el valor mínimo pertenecía al extracto de té verde (1744,12±20,59 μmol ET/ml).

Los tratamientos de las combinaciones de té verde con ácido ascórbico, debido su naturaleza antioxidante presentaron valores de 31149,01±1343,40 μmol ET/ml para 5%TV+0,5%AA hasta 284254,10±5139,47μmol ET/ml para el caso de 5%TV+5%AA.

Se puede observar en la figura anterior que la AAox obtenida de la combinación de ascórbico con té verde fue muy similar a la que se obtuvo cuando el ácido orgánico se encontraba individual ( $p > 0,05$ ), excepto para la máxima concentración, donde difirieron estadísticamente ( $p < 0,05$ ).

Esto quiere decir que la actividad antioxidante del extracto es prácticamente despreciable en comparación con la del ascórbico, aunque la AAox de este ácido es temporal y acaba por agotarse como se explicará más detalladamente en el siguiente capítulo.

Los tratamientos cuyos valores resultaron ser los más bajos corresponden al propio extracto de té verde (como se ha visto anteriormente) y a su combinación con el ácido cítrico, debido a que la actividad antioxidante fue debida a la presencia de té verde. El mayor poder antioxidante de estos últimos tratamientos fue de  $2054,85 \pm 66,71$   $\mu\text{mol ET/ml}$  para el caso de 5%TV+0,5%AC, y el valor mínimo pertenece al extracto de té.

Por último se puede observar que la concentración parece no tener efecto sobre la AAox en la combinación de té y cítrico, debido a que éste no posee ninguna actividad antioxidante, no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos, excepto para la concentración más elevada de cítrico ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2.2 Contenido total en fenoles de las soluciones antipardeantes

Los tratamientos seleccionados fueron las combinaciones de TV+AC y TV solo. La combinación de TV+AA no pudo ser medida ya que el fundamento de esta reacción es medir la capacidad reductora total de la muestra, no solo el contenido en compuestos fenólicos, por lo tanto reaccionará con cualquier sustancia reductora, como el ácido ascórbico.

En la figura 40 se pueden observar el contenido total en fenoles de los tratamientos analizados. Las mediciones se realizaron por triplicado.

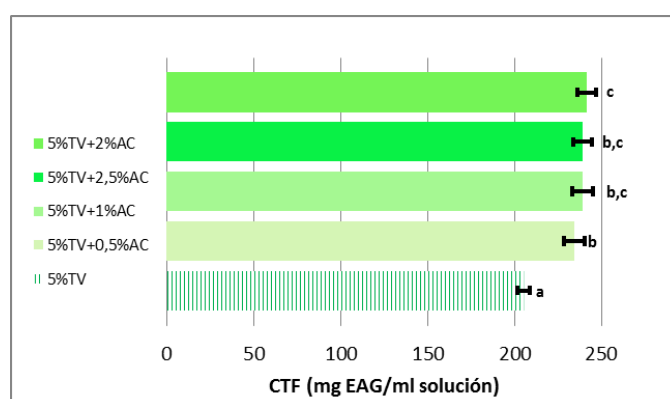


Figura 40: Contenido total de fenoles (mg equivalentes de ácido gálico/ml solución)

El contenido total de fenoles (CTF) de los 5 tratamientos medidos no mostraron grandes diferencias en los valores, estando el contenido más elevado en  $241,59 \pm 5,39$



mg EAG/ml solución para el tratamiento de 5%TV+2%AC y el valor más pequeño en 205,29±3,66 mg EAG/ml para la solución de extracto de té verde.

En este gráfico se puede observar la similitud de los valores obtenidos en el contenido total de fenoles con la adición de ácido cítrico ácidos, no encontrándose diferencias significativas para las concentraciones de 1 y 2,5% de AC.

Además también destaca que la cantidad de fenoles aumentaba con la adición de AC al TV, pudiendo deberse a que el ácido realiza una cierta hidrólisis en los compuestos del té liberándolos, haciéndolos a éstos presentes en la medición.

### **4.3 Determinación de la capacidad de inhibición de los tratamientos antipardeantes seleccionados sobre la PPOp**

El ensayo se realizó de la misma manera que para la determinación de la capacidad antipardeante del té verde a diferentes pHs como se indicó en el apartado 4.1.2, pero en este caso se midió la capacidad de inhibición de la PPOp del ácido cítrico y ácido ascórbico de forma individual y en combinación con el ETV.

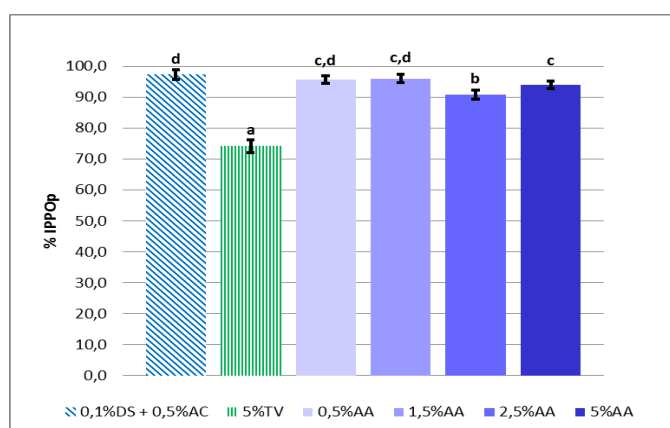
Los tratamientos de referencia con los que se compararon fueron el disulfito (DS+AC), como tratamiento tradicional, y el té verde (TV), como referencia de los compuestos naturales y el cual fue evaluado para observar si mejoraba o no en combinación con otros compuestos.

Dicha medición se realizó usando dos lotes de extracto crudo de PPOp que procedían de dos lotes de patatas distintos, los cuales no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ).

#### **4.3.1 Capacidad de inhibición de las soluciones individuales de ácidos orgánicos sobre la PPOp**

##### **a) Ácido ascórbico**

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la capacidad antipardeante de estas soluciones de AA a diferentes concentraciones (figura 41).



**Figura 41: Capacidad de inhibición (%) de la PPOp del AA a diferentes concentraciones**

Los resultados aparecidos en la gráfica anterior muestran la elevada potencialidad para la inhibición del disulfito con un porcentaje de cerca del 99% de la PPOp.

Este resultado era de esperar, ya que es un compuesto que se usa debido a que su mecanismo de acción es inhibir irreversiblemente a la PPO, que como ya se indicó, produce un efecto sobre el pardeamiento a nivel enzimático y no enzimático que se ve reforzado por la presencia de ácido cítrico (DS+AC).

El té verde presenta un %IPPO del  $74,19 \pm 2,02$ , valor similar al obtenido por Bobo (2014) donde a una concentración del 6% consiguió un porcentaje de inhibición de  $72,2 \pm 0,2$  %, que resulta ser un valor alto para ser un compuesto natural, teniendo en cuenta que el AA es un potente antioxidante, por lo que su efecto *in vitro* sobre la PPOp es inmediato en las condiciones establecidas.

El uso de la menor concentración de AA (0,5%) presentó valores superiores al 90% de inhibición. La aplicación de las diferentes concentraciones de 0,5, 1,5 y 5% AA no mostró diferencias significativas sobre la inhibición de la PPOp ( $p > 0,05$ ), excepto para el caso de la concentración de 2,5%AA ( $p < 0,05$ ).

Aunque los valores de %IPPO para el tratamiento de ácido ascórbico individual sean tan elevados, se ha de saber que su efecto no es totalmente duradero y que acaba agotándose en un plazo de tiempo corto, ya que se oxida irreversiblemente a ácido dehydroascórbico durante el proceso de reducción.

Esta oxidación acaba permitiendo así el pardeamiento por agotamiento del compuesto presente, por lo que su aplicación de forma individual no es muy efectiva, sobre todo el productos mínimamente procesados donde se pretende alargar la vida útil del producto. Debido a ello se suele usar en combinación con algún otro agente antipardeante.

A pesar de conseguir un %IPPO inferior con el TV en comparación con el obtenido por el AA y el DS+AC, este valor es bastante elevado, además de ser el tratamiento que menos inconvenientes posee, ya que como se ha citado anteriormente, el AA acaba agotándose y permitiendo el pardeamiento al cabo del tiempo, y para el caso de los sulfitos, el objetivo perseguido es poder buscar alternativas a su uso.

Conseguir una inhibición tan elevada con un agente natural antipardeciente como es el extracto de té verde, el cual no acidifica el medio, es debido a que es una excelente fuente de polifenoles, los cuales son antioxidantes, y que posee ciertos compuestos que podrían estar actuando como inhibidores naturales de la reacción, tal y como indicaron Pruidze y Grigorashvili (1977), donde encontraron que el té verde contiene pequeños péptidos que pueden actuar como inhibidores.

El hecho de que la enzima PPO posea dos lugares en el centro activo, indica que existen compuestos que actúan de activadores de la reacción y mientras que otros compuestos, incluidos algunos polifenoles, pueden actuar como inhibidores de la misma enzima. Además se sabe que puede cambiar el grado de inhibición en función del polifenol activador que se una a la enzima (Vámos-Vigyázó, 1981), lo que implica que las interacciones y comportamiento de las reacciones son muy complejas.

### **b) Ácido cítrico**

Lo primero que hay que señalar es que las soluciones de ácido cítrico (AC) al 0,5% y al 1% fueron eliminadas ya que los resultados no eran cuantificables debido a que su capacidad de inhibición era prácticamente nula, lo que indica que el único efecto sobre el pardeamiento está relacionado con su poder acidulante, y por ello sólo fueron efectivas las concentraciones más elevadas.

En la figura 42 se observa el gráfico donde aparece el efecto de las concentraciones aplicadas cuantificables de ácido cítrico sobre la PPOp.

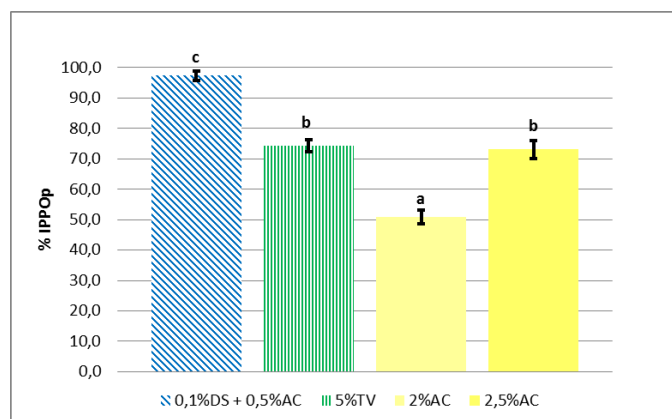


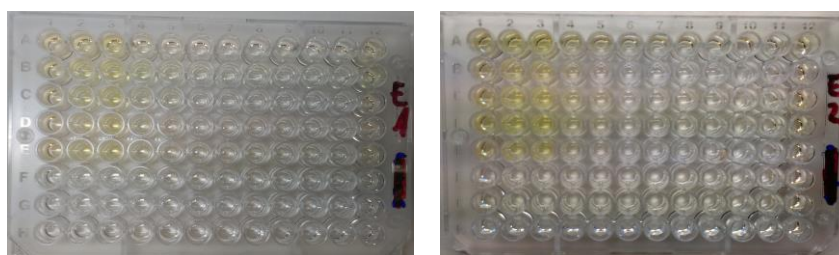
Figura 42: Capacidad de inhibición (%) de la PPOp del AC a diferentes concentraciones

La solución de 2% de ácido cítrico difirió estadísticamente del resto de soluciones aplicadas ( $p < 0,05$ ), su capacidad antipardeante fue la más baja de todos los tratamientos aplicados ( $50,97 \pm 2,25$ ), estando incluso por debajo del ETV, es decir, la aplicación de AC no mejoró al tratamiento de referencia.

Para el caso de la mayor concentración aplicada de cítrico (2,5%AC) mostró una capacidad de inhibición igual que el ETV al 5% ( $p > 0,05$ ) en las condiciones establecidas, lo que indicó que a nivel *in vitro* inhibe la enzima, pero existen diferentes estudios como el de Ma *et al.*, (2010) en donde el AC aplicado individualmente no fue efectivo para controlar el pardeamiento a lo largo del almacenamiento en PMP en condiciones reales, es decir, *in vivo*.

Por lo que su aplicación en solitario a cualquiera de sus concentraciones en PMP no resultaría interesante ya que lo que el objetivo de este trabajo es buscar alternativas que mejoren la capacidad antipardeante de los tratamientos ya estudiados o investigados.

Como apoyo a los resultados obtenidos en la aplicación de las soluciones de AA y AC en solitario sobre la inhibición de la PPOp, se presentan fotografías tomadas a las microplacas tras la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro a 420 nm (figura 43).



**Figura 43: Microplacas con las soluciones de ácidos orgánicos tras la medición de la absorbancia a 420 nm (enzima 1 y enzima 2)**

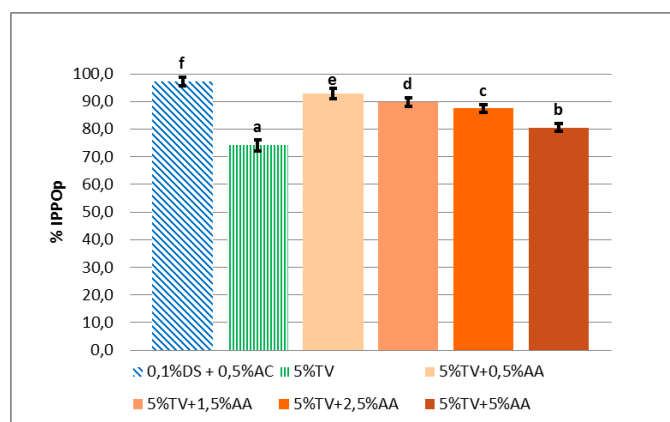
En la figura anterior se observan unas coloraciones amarillentas correspondientes a las distintas concentraciones de AC que se relacionan directamente con el menor %IPPOp, en comparación con el resto de la microplaca donde se encuentran las soluciones de AA y DS+AC, estando los pocillos totalmente transparentes, es decir, donde se obtuvieron los mayores resultados del %IPPOp.

Una vez analizados los resultados de los ácidos orgánicos de forma individual sobre la PPOp, se pasó a evaluar el efecto de la combinación del té verde con estos.

#### **4.3.2 Capacidad de inhibición de las soluciones combinadas de té verde con ácidos orgánicos sobre la PPOp**

##### **a) Te verde y ácido ascórbico**

En la figura 44 se muestran los resultados obtenidos de la capacidad de inhibición de la combinación de TV+AA respecto a las soluciones de referencia, es decir, el disulfito y el té verde.



**Figura 44: Capacidad de inhibición (%) de la combinación de TV+AA sobre la PPOp**

Las soluciones aplicadas de TV+AA tuvieron un efecto inhibitorio elevado, con valores superiores al 80% fuera cual fuera la concentración de AA, llegando hasta un  $92,74 \pm 1,85$  cuando se aplicaba la concentración más baja de AA, es decir, con 5%TV+0,5%AA.

La combinación de té verde con ácido ascórbico produjo un efecto sinérgico, en las condiciones estudiadas, sobre la capacidad de inhibición de la PPOp al estar por encima del tratamiento de referencia de té verde en cualquiera de sus concentraciones. Esta combinación hizo que ambos agentes uniesen su gran capacidad antiparadeante frente a la reacción de la PPOp.

El disulfito, como se ha dicho en todo momento, es el agente más potente que existe sobre la inhibición de la PPOp y éste se encontraba muy próximo a los valores

que ofreció la combinación de ascórbico y té verde, pudiendo ser una alternativa en su uso como se puede observar en la figura anterior.

Por último, destaca que la concentración de AA marcó una tendencia descendente, es decir, que para una concentración mayor de ácido ascórbico, se registraba el menor efecto inhibitor, mostrando diferencias significativas entre todas las concentraciones estudiadas ( $p < 0,05$ ).

Que la combinación de AA y TV a la mayor concentración diese lugar a la menor inhibición, pudo ser debido a que el complejo formado por ambos compuestos fuese tan potente que llegó a saturar a la enzima y no se logró inhibirla al mismo nivel que para concentraciones menores, además de que un aumento de la concentración de ácido ascórbico incrementa la velocidad de degradación de éste a ácido dehydroascórbico.

Esto hace pensar que utilizar la menor concentración sería lo adecuado para próximos estudios sobre PMP ya que produce la mayor inhibición, pero como se verá a continuación, esto no fue así porque hay que tener en cuenta el resto de parámetros que implica la inhibición de PPOp.

### **b) Te verde y ácido cítrico**

En la figura 45 se muestran los resultados obtenidos de la inhibición de la PPOp, donde se compararon las combinaciones de TV+AC a diferentes concentraciones con los tratamientos de referencia, DS+AC y TV.

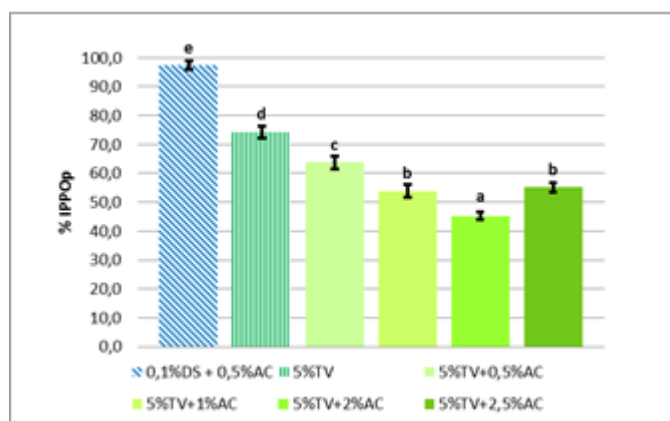


Figura 45: Capacidad de inhibición (%) de la combinación de TV+AC sobre la PPOp

Los resultados obtenidos sobre el %IPPO cuando se combina té verde con ácido cítrico indicaron que no existe un beneficio en la combinación de estos dos compuestos, ya que al igual que ocurría cuando se aplicaba únicamente ácido cítrico como solución antipardeante, la combinación de este ácido orgánico con el extracto de té no mejoró los resultados de los tratamientos de referencia, estando en todo momento por debajo de ellos.

El valor más elevado de inhibición (%) que se obtuvo por la combinación de 5%TV+0,5%AC fue de  $63,76 \pm 2,29$ , el cual sigue siendo inferior que cuando se aplicaba la solución de referencia de té verde ( $74,19 \pm 2,02$ ).

Es decir, la combinación de TV+AC no mejoró el efecto del tratamiento de referencia cuando éste se aplicaba individualmente, tanto es así que incluso dicha combinación mostraba menos capacidad de inhibición de la PPOp que cuando el ácido orgánico se encontraba en solitario, es decir para un 2%AC individual se producía un 50,97% frente a un 45,27% cuando se combinaba con TV, y para 2,5%AC se registró un 73,12% frente a un 55,14% con su combinación.

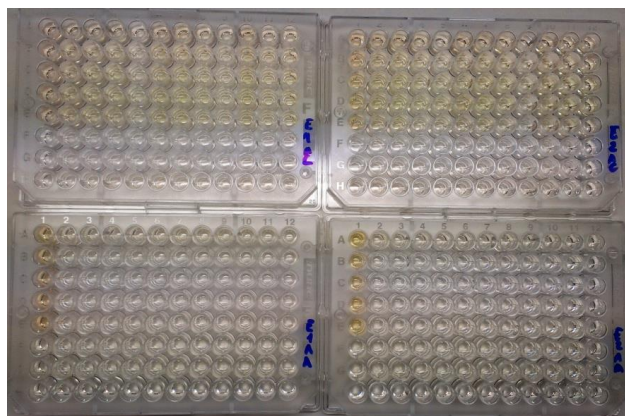
Para el resto de combinaciones, 5%TV+1%AC y 5%TV+0,5%AC se consiguió un %IPPOp inferior en comparación al que se registró con un 2,5% AC ( $73,12\%$  a 2,5% AC vs  $63,76\%$  a 5%TV+0,5%AC y  $53,91$  a 5%TV+1%AC).

Esto es debido posiblemente a que la bajada de pH por el carácter acidulante del ácido cítrico fue tan elevada que afectó a los compuestos con poder inhibidor de la composición del ETV.

Por lo tanto, viendo los resultados de la combinación de ETV+AC, resulta poco interesante su futura aplicación en estudios sobre PMP, ya que su efecto no muestra resultados aceptables.

Como una forma más ilustrativa de los resultados, en la figura 46 se muestran las coloraciones aparecidas en las microplacas tras la medición *in vitro* de a 420 nm que apoyan a los resultados obtenidos empíricamente.





**Figura 46: Microplacas con las combinaciones de TV+AC (arriba) y TV+AA (abajo) tras la medición de la absorbancia a 420 nm**

Las microplacas aparecen por duplicado ya que se hicieron para dos extractos de enzimas diferentes.

Las tonalidades amarillentas correspondientes a la combinación de TV+AC en las placas superiores fueron debidas a la reacción de pardeamiento enzimático, correspondiéndose con los %IPPOp más bajos. En las microplacas inferiores de TV+AA se observa una transparencia muy clara, ya que se consiguieron %IPPOp elevados y no tuvo lugar la reacción de pardeamiento.

Como ya se vio en el apartado 4.3.1 y 4.3.2, los tratamientos con AC y TV+AC, no fueron llevados a estudios sobre PMP por lo ya explicado anteriormente.

Para el caso de AA como se vio en el apartado 4.3.1, ninguna de las concentraciones fue llevada al estudio en PMP ya que, aunque el %IPPO obtenido fue muy alto, su efecto acaba por agotarse dando lugar al pardeamiento y además, existen estudios como el de Ma *et al.*, (2010) entre otros, que indicaron que por sí solo aplicado en el producto no consigue un control de pardeamiento aceptable.

En la combinación de TV+AA vista en el apartado 4.3.2, a pesar de que la menor concentración registró el mayor %IPPOp, no se aplicó en PMP ya que fue necesario tener en cuenta varios factores como que el AA se consume al actuar como antioxidante y acaba por agotarse, el pH final que tiene la reacción cuando se aplica el tratamiento y la actividad posee la PPOp a dicho pH.

En el apartado 4.2.1 se determinó el pH de la solución final de cada tratamiento, en donde para la combinación de 5%TV+0,5%AA se obtuvo un 6,34, muy próximo a pH óptimo de 6,5, por lo que hay que intentar reducirlo, ya que uno de los métodos antipardeantes es disminuir el pH de la solución, por lo tanto esta combinación no fue seleccionada para el estudio en PMP.

El hecho de que el AA tenga un efecto temporal, indica que la aplicación a largo plazo en almacenamiento, la concentración más alta sea la más efectiva, pero a mayor concentración, mayor velocidad de degradación por lo que la combinación de 5%TV+5%AA no fue seleccionada, además de que una concentración tan elevada de AA puede llegar a producir efectos sobre la calidad sensorial.

Por lo tanto las combinaciones utilizadas en los estudios posteriores fueron: 5%TV+1,5%AA con un pH de 6,08 y 5%TV+2,5%AA con un pH final de 5,6, que consiguieron cierta reducción de pH además de registrarse %IPPO *in vitro* superiores al 87% en las condiciones establecidas.

#### 4.4 Efecto de los agentes antipardeantes sobre la vida útil acelerada en patata cv. *Monalisa* mínimamente procesada

Tras analizar los resultados obtenidos en la capacidad de inhibición de los tratamientos, su actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales, los agentes antipardeantes fueron aplicados en la matriz del alimento elegido, en este caso la patata cv. *Monalisa* para estudiar el efecto de éstos en condiciones aceleradas, las soluciones fueron:

- a) 0,1% disulfito de sodio + 0,5% ácido cítrico
- a) 5% extracto de té verde
- b) 5% extracto de té verde + 1,5% ácido ascórbico
- c) 5% extracto de té verde + 2,5% ácido ascórbico
- d) Control

Todos los tratamientos antipardeantes se prepararon por triplicado, y en cada uno de ellos se sumergieron 5 lonchas de patata, tratando un total de 15 lonchas a las cuales se les midió los parámetros de color L\*, a\* y b\* por triplicado y se cogió la media de cada uno de ellos.

##### 4.4.1 Caracterización de la patata

Para la caracterización de las patatas cv. *Monalisa* con las que posteriormente se evaluó la capacidad antipardeante de las soluciones seleccionadas, se determinaron tres parámetros: pH, contenido en sólidos solubles (SST) y contenido en humedad.

En la tabla 13 se observan los resultados obtenidos (promedio obtenido y desviación estándar) de cada parámetro para el conjunto de los tres lotes compuesto de 9 patatas en total.

Tabla 13: Parámetros físicos estudiado de la patata cv *Monalisa*

pH	Contenido en humedad (%)	Sólidos solubles totales (°Brix)
6,11 ± 0,01*	80,45 ± 1,06	6,00 ± 0,00

\*media ± desviación estándar

Los valores de pH y SST fueron ligeramente superiores a los obtenidos por Pardo *et al* (2000) para el cv. *Monalisa*, cuyos valores eran de 5,92 y 5,5 respectivamente.

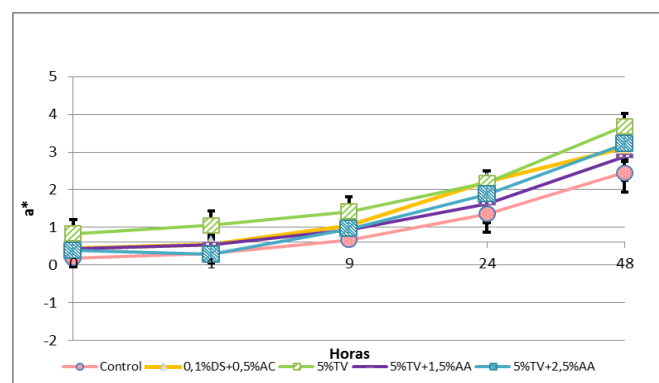
Para el caso del contenido en humedad (%) el valor obtenido en este estudio fue levemente inferior al de dichos investigadores, (%Humedad=80,45 vs 81,80). De los resultados obtenidos se pudo observar, cómo ya explicó Burton (1967), que la patata posee un elevado contenido en humedad, haciendo que este tubérculo este constituido por agua en más de tres cuartas partes de su peso.

#### **4.4.2 Efectos de los tratamientos aplicados sobre el color**

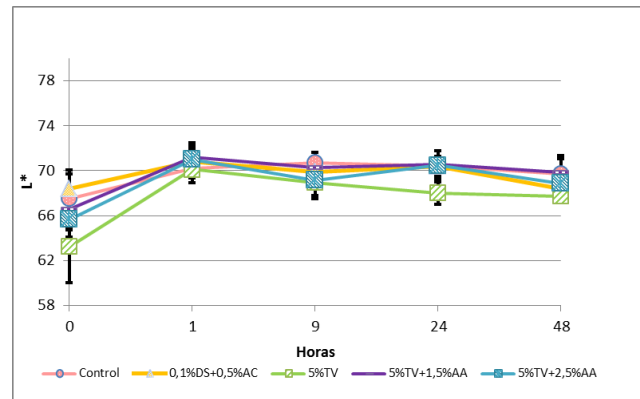
Los parámetros de color  $L^*$  y  $a^*$  han sido utilizados por diversos autores como indicadores de pardeamiento enzimático en la superficie cortada de vegetales como la patata, y de frutas como las peras y las manzanas (Monsalve-González *et al.*, 1993; Rojas-Graü *et al.*, 2008).

Como ya explicó Rocha y Morais, 2003, en un estudio sobre la vida útil en manzana mínimamente procesada, el valor  $L^*$  es un indicador del oscurecimiento, cuyo descenso indica reacciones de pardeamiento oxidativo o un aumento de las concentraciones de los pigmentos; y un aumento en el valor de  $a^*$  indica un aumento en la tonalidad rojiza del tejido del producto.

Las medidas de color (valores promedio  $L^*$  y  $a^*$ ) y el intervalo de confianza 95%, (n=15) para las horas 0, 1, 9, 24 y 48 en las patatas control y las tratadas con las soluciones antipardeantes se representan en las figuras 47 y 48, respectivamente.



**Figura 47: Evolución de la luminosidad ( $L^*$ ) a lo largo de 48 horas almacenadas a 25 °C y 75% H.R en las PMP tratadas con las soluciones antipardeantes seleccionadas**



**Figura 48: Evolución del parámetro  $a^*$  a lo largo de 48 horas almacenadas a 25°C y 75% H.R en las PMP tratadas con las soluciones antipardeantes seleccionadas**

El **valor de luminosidad ( $L^*$ )** (figura 47) inicial para la patata control fueron levemente superiores a los recogidos por Pardo, *et al.* (2000) para el mismo cultivar de patata ( $L^* = 67,54$  vs  $65,9$ ).

La aplicación del tratamiento antipardeante afectó a la luminosidad de las muestras ( $p < 0,05$ ) para tiempo 0 horas, es decir tras ser sumergidas durante 7 minutos, las lonchas de patatas mostraron diferencias significativas en el parámetro  $L^*$ , donde el valor más bajo se encontró en el tratamiento de 5%TV ( $63,24 \pm 6,34$ ), seguido de las combinación de 5%TV+2,5%AA y 5%TV+1,5%AA ( $65,67 \pm 3,10$  y  $66,57 \pm 3,61$ , respectivamente) hasta el tratamiento con DS+AC que presentó el valor más elevado de  $L^*$  para tiempo 0 horas, con  $68,68 \pm 2,67$ .

Es decir, la aplicación de 5%TV para la hora 0 hizo descender el valor de luminosidad con respecto a la patata inicial, viéndose aumentado con la aplicación del ácido orgánico.

Tras 24 horas de almacenamiento, las muestras presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, ya que como se observa, las lonchas tratadas únicamente con 5%TV presentaron los valores más bajos ( $68,04 \pm 2,04$ ) en luminosidad respecto al resto de tratamientos.

Destaca, que tras el almacenamiento, las lonchas registraron un valor de  $L^*$  superior que para la hora 0, es decir, se produjo un aumento de su luminosidad,

cuando lo que cabría esperar sería un descenso de este parámetro perdiendo luminosidad en las lonchas.

Para el resto de horas de almacenamiento, las muestras no mostraron diferencias significativas entre sus valores de luminosidad ( $p > 0,05$ ), encontrándose muy próximas entre sí, aunque es destacable el comportamiento de las tratadas con té verde, mostrando en todo momento los valores inferiores del parámetro  $L^*$ .

Esto pudo ser debido a la propia coloración que otorgan los polifenoles a la muestra, más concretamente los flavonoides, pigmentos naturales que confieren la tonalidad amarillenta haciendo que el parámetro  $L^*$  disminuya con respecto al resto de tratamientos.

También es destacable el comportamiento de las muestras control, que ofrecía valores incluso más elevados que el tratamiento con DS+AC en las horas 9, 24 y 48, (70,75±1,71 vs 69,87±1,72; 70,42±2,74 vs 70,36±1,38; 69,72±3,31 vs 68,36±1,82, respectivamente).

Estos valores resultaron especialmente anómalos en comparación con el disulfito, ya que como es bien sabido, éste llega a blanquear a las muestras, pero en este estudio de vida útil acelerado, el tratamiento con disulfito mostró valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) en comparación con el resto de tratamientos transcurridas 24 horas, en donde las soluciones de 5%TV+1,5%AA y 5%TV+2,5%AA resultaron tener la mayor luminosidad de las muestras (70,55±2,39 y 70,50±1,60, respectivamente).

En la tabla 14 mostrada en el siguiente apartado se recogen las apreciaciones sensoriales durante las 48 horas del almacenamiento para cada tratamiento que pueden dar lugar a una explicación a esto, como fue la presencia de almidón reseco en las lonchas que produjo lecturas blanquecinas, haciendo que el espectrofotómetro recogiese lecturas incorrectas.

En cuanto a la evolución de la **coordenada  $a^*$**  (figura 48), se observa una clara diferencia en su evolución en comparación con el parámetro  $L^*$ .

Las lonchas control en el momento inicial presentaron un valor de  $a^*$  de 0,18 (Figura 48), un valor mucho más alto que el indicado por Pardo *et al.* (2000), que trabajando con el mismo cultivar, establecieron valores de  $a^* = -2,9$ .

A la hora 0 el valor de las patatas control fue significativamente más bajo ( $p < 0,05$ ) que los valores obtenidos en las muestras tratadas con el resto de soluciones, incluso para las tratadas con DS+AC ( $0,18 \pm 0,44$  vs  $0,44 \pm 0,41$ ).

Durante todo el almacenamiento, excepto para la hora 24, la aplicación de TV a las muestras de patata, mostró los valores más altos de  $a^*$  respecto al resto, lo cual indica una coloración más marcada, como se observa en las apreciaciones sensoriales (tabla 14) y en las fotografías tomadas a las lonchas durante las 48 horas de almacenamiento para cada tratamiento en la figura 54, aparecidas a continuación.

Esto pudo ser debido como se ha visto anteriormente con el parámetro  $L^*$ , a la coloración amarillenta del extracto de té verde que pudo estar aportando una ligera coloración a las patatas

La adición de AA al TV influyó significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre la coordenada  $a^*$  durante todo el almacenamiento, dando valores en todo momento inferiores a los ofrecidos con la solución de TV, incluso menores que cuando se aplicaba el tratamiento de DS+AC. Significando que la adición de AA al TV influyó en las coloraciones que se observan tras 48 horas de almacenamiento, en donde el valor de la menor concentración de AA (1,5%), dio lugar a un valor inferior que para el caso de la mayor concentración (2,5%), aunque no mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ) ( $2,88 \pm 1,25$  vs  $3,21 \pm 0,94$ , respectivamente).

Además, la solución de 5%TV+1,5%AA también mostró valores más altos de  $L^*$  en comparación con la aplicación de 5%TV durante todo el almacenamiento, siendo incluso los valores de luminosidad más elevados en comparación con el resto de soluciones en las horas 1, 24 y 48.

Lo que indicaría y confirmaría, que la adición del ácido orgánico al extracto de té verdad, parece mejorar los parámetros  $L^*$  y  $a^*$  en las condiciones establecidas para este estudio acelerado sobre las lonchas de PMP.

Para observar de forma global el comportamiento de las lonchas analizadas se muestran las siguientes gráficas (figura 49, 50, 51, 52 y 53), en las que se representa la luminosidad con respecto a los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ .

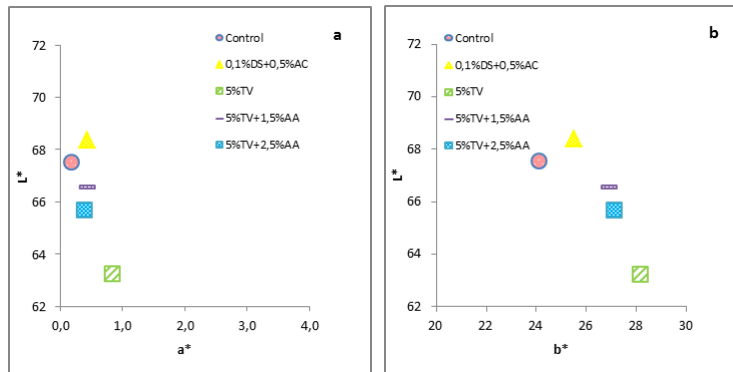


Figura 49: Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 0, representando luminosidad vs. coordenada  $a^*$  (a) y respecto a coordenada  $b^*$  (b)

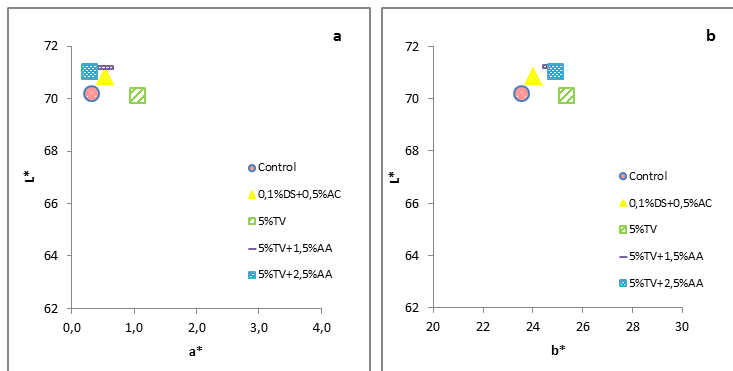


Figura 50: Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 1, representando luminosidad vs. coordenada  $a^*$  (a) y respecto a coordenada  $b^*$  (b)

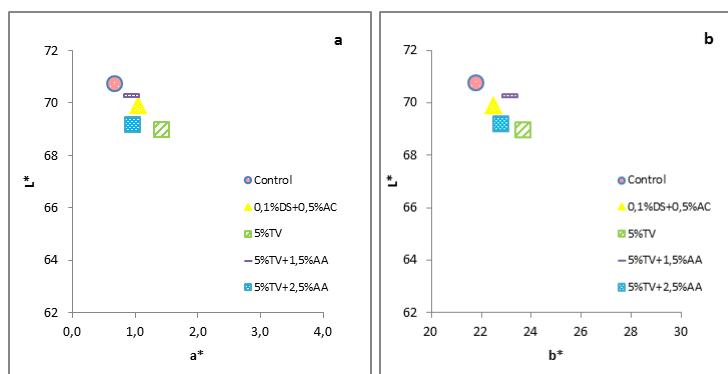


Figura 51: Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 9, representando luminosidad vs. coordenada  $a^*$  (a) y respecto a coordenada  $b^*$  (b)



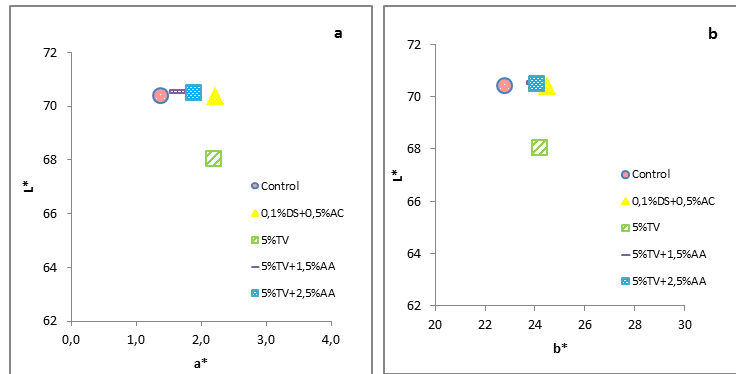


Figura 52: Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 24, representando luminosidad vs. coordenada a\* (a) y respecto a coordenada b\* (b)

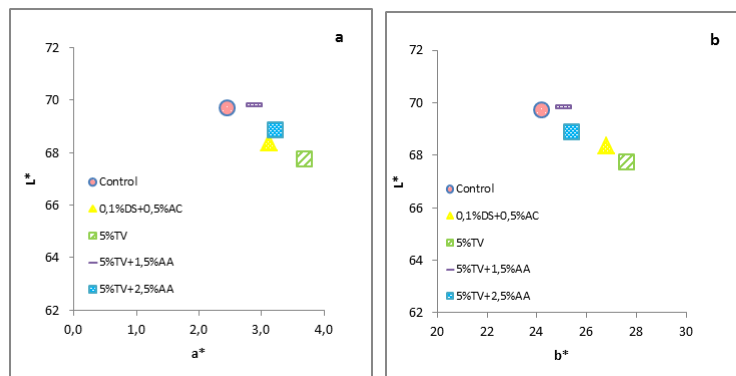


Figura 53: Disposición del color de las lonchas tratadas a la hora 48, representando luminosidad vs. coordenada a\* (a) y respecto a coordenada b\* (b)

Para la **hora 0**, es decir, tras ser sumergidas en la solución antipardecante, se observan ciertas diferencias a nivel instrumental, pero no a nivel visual (tabla 14 y figura 54).

A la **hora 1**, se observa como la luminosidad aumentó en todas muestras y se crean tres grupos homogéneos en función de este parámetro y la coordenada a\*: la muestra control y 5%TV+2,5%AA con los valores más bajos de a\*, DS+AC y 5%TV+1,5%AA con una luminosidad similar al anterior grupo pero con valores de a\* superiores, y por último la muestra de 5%TV, la cual mantuvo el mismo comportamiento que para la hora 0.

Respecto a b\* solo destacar como 5%TV mostró valores más altos que el resto, lo que indica que mantuvo la coloración amarillenta característica de la patata fresca

debido quizás a la coloración propia de la solución como muestran las fotografías tomadas en la figura 54.

La misma tendencia de la muestra control de mantener los valores más bajos de  $a^*$  junto con el comportamiento contrario de la muestra de TV de mantener los valores más elevados de este parámetros, fue lo más destacable para la hora 9, en donde los valores de luminosidad no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre tratamientos.

Tras **24 horas** de almacenamiento, se puede observar como el parámetro  $a^*$  se elevó considerablemente para todas las muestras, ya que se comenzó a desarrollar signos de pardeamiento, sobre todo en las lonchas control y en las tratadas con 5%TV+2,5%AA en zonas muy localizadas en lugar de extenderse por la superficie (figura 54), lo que a nivel instrumental no se recoge.

La muestra control siguió con el mismo comportamiento de mantener los valores más bajos de  $a^*$ , pero instrumentalmente (figura 52), porque en las apreciaciones sensoriales es la que peor apariencia muestra (tabla 14 y figura 54).

Las soluciones antipardeantes aplicadas de TV+AA mantuvieron unos niveles de luminosidad aceptables, y la solución con la menor concentración de ascórbico presentó un valor inferior de la coordenada  $a^*$ , pudiendo deberse a los depósitos de almidón que quedaron marcados en la superficie de la loncha, aunque como se recoge en las apreciaciones sensoriales, estos depósitos fueron mayores cuando se aplicaba 5%TV individual que cuando se combinaba con el ácido orgánico (AA).

Para la coordenada  $b^*$  no se encuentran diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los valores obtenidos, manteniendo una intensidad amarillenta en las lonchas, excepto para la muestra control donde el valor de  $b^*$  desciende.

Tras **48 horas** la tendencia general fue el aumento de los valores de  $a^*$ , donde se detectaron diferencias significativas entre todos los tratamientos incluido el control (Control>5%TV+1,5%AA>DS+AC>5%TB+2,5%AA>TV) lo que indicaría junto con valores bajos de  $L^*$  que se estaba produciendo pardeamiento, como muestra la figura 54.

La muestra control siguió con el mismo comportamiento mostrando valores más bajos de  $a^*$ , sin embargo se observaban signos de pardeamiento en zonas como en los bordes y en superficies muy localizadas, lo que a nivel instrumental fue muy difícil de recoger.

El tratamiento de 5%TV+1,5%AA tras 48 horas de almacenamiento, mostró resultados de luminosidad elevados aunque en consonancia con la pérdida de intensidad del color característico de las lonchas de patata debido a la oxidación de los polifenoles a compuestos coloreados como son las tearrubiginas de colores marrones y rojos (figura 54).

Respecto a los valores de  $b^*$ , las diferentes muestras mantuvieron prácticamente los mismos valores que para la hora 0, variando significativamente entre los tratamientos aplicados ( $p < 0,05$ ), donde la aplicación de 5%TV a las lonchas de patata mantuvo la misma tendencia de poseer el valor más elevado de este parámetro durante las 48 horas de almacenamiento, lo cual refuerza la hipótesis de que el propio extracto aporta un cierto color a las patatas debido a la coloración que otorgan los polifenoles.

Por último, el comportamiento de las lonchas a las 48 horas tras ser tratadas con DS+AC o TV+AA dio lugar a valores intermedios, debido quizás al uso de los ácidos orgánicos, y el comportamiento de las muestras control que presentó los valores más bajos de  $a^*$  y  $b^*$  instrumentalmente, debido a que los depósitos de almidón estaban muy marcados, sin embargo en la figura 54 se puede observar que son las que peor apariencia presentaban.

#### **4.4.3 Apreciaciones sensoriales del efecto de los tratamientos aplicados sobre las patatas mínimamente procesadas**

Tras la medida instrumental del color sobre las lonchas de patata para observar el efecto de las soluciones antipardeantes en ellas, se pasa a comentar las apreciaciones sensoriales observadas durante los análisis a las diferentes horas de almacenamiento (0, 1, 9, 24 y 48 horas) (tabla 14), donde se muestran puntuaciones

de 0 a 3 sobre cada aspecto evaluado en cada muestra para los diferentes tratamientos.

**Tabla 14: Puntuaciones establecidas para cada atributo sobre las apreciaciones sensoriales en las PMP durante las 48 horas de almacenamiento**

Tratamiento	Hora	Color	Olor	Textura	Sequedad superficial	Apariencia general
Control	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	9	1	0	1	1	1
	24	2	0	2 (blanda)	3	3
	48	3	0	3	3	3
0,1%DS+0,5%AC	0	0	0	0	0	0
	1	0	1 (sulfitos)	0	0	0
	9	0	2 (sulfitos)	0	0	0
	24	1 (halo pálido)	2 (sulfitos)	1 (rígida)	0	1
	48	2	3	2 (blanda)	1	2
5%TV	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	9	1 (intenso)	0	1	1	1
	24	2	0	1 (blanda)	1	2
	48	2	0	2	2	2
5%TV+1,5%AA	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0
	24	2	0	1(blanda)	1	1
	48	2	0	1	2	2
5%TV+2,5%AA	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	9	1	0	0	0	1
	24	2	0	1 (blanda)	1	2
	48	2	0	2	2	2

0: Buen color/olor/textura/apariencia, similar a recién procesada

1: Ligero cambio color/olor/textura/apariencia (aspecto seco ligero)

2: Aparición de coloraciones pardeadas (áreas puntuales o extendidas)/olores extraños/pérdida de turgencia moderada/sequedad marcada

3: Cambio severo en el color (coloraciones pardas)/olores totalmente indeseables/grandes cambios de textura/muy mala apariencia general

Las apreciaciones registradas en la anterior tabla acerca de la apariencia se presentan con el apoyo de fotografías (figura 54), donde se puede visualizar los cambios producidos en las muestras durante su almacenamiento y la comparativa entre los diferentes tratamientos, incluido el control:

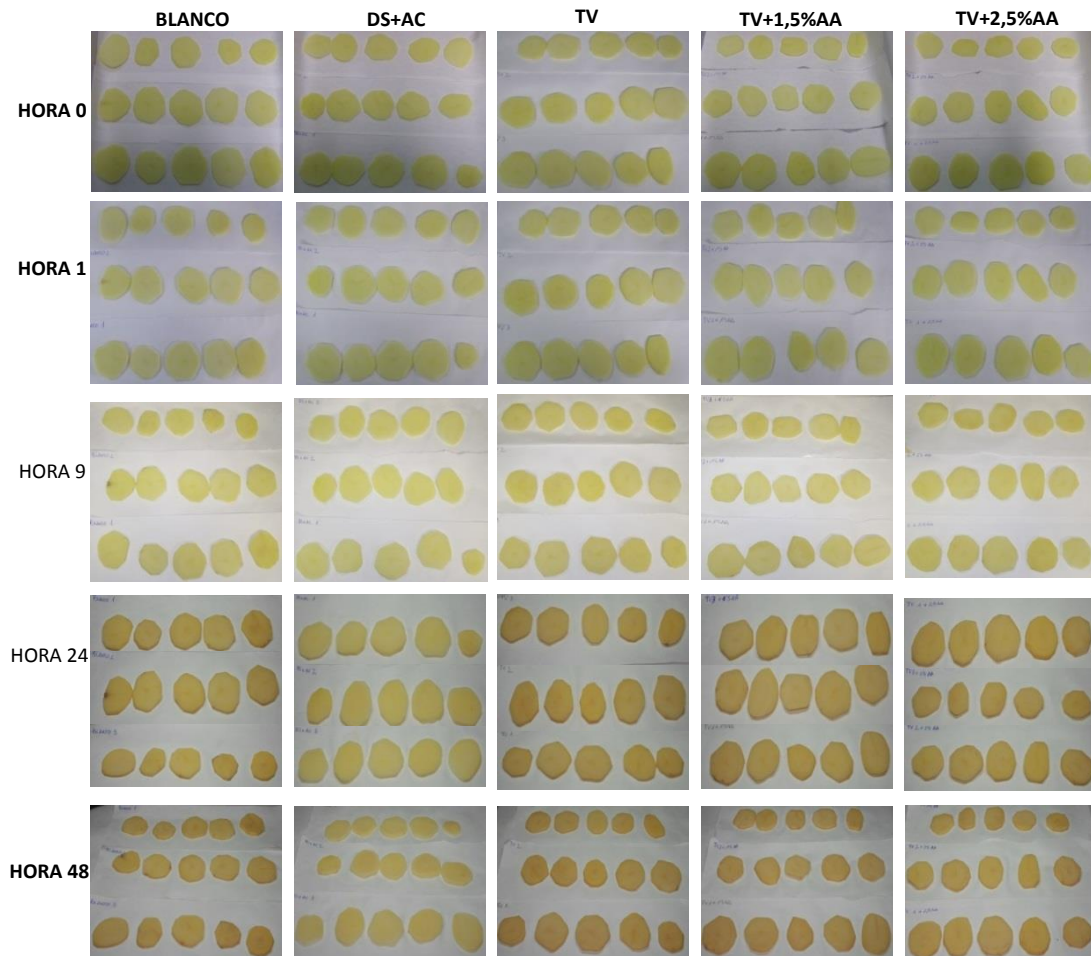


Figura 54: Evolución en el aspecto de las PMP tras 48 horas en almacenamiento a  $25\pm 1$  °C y 75%H.R tras haber sido inicialmente tratadas con las soluciones antipardeantes

En cuanto a las observaciones realizadas y registradas durante la **hora 0 y 1** de análisis, a nivel apariencia no se detectaron defectos ni cambios en el color, aunque sí que hay que destacar, que durante el procesado de la patata hubo lonchas que sufrieron daños su superficie debido a las cuchillas, como muestra la primera loncha de la muestra control 2, en donde se produjo signos de pardeado a una velocidad superior que para el resto de muestras debido a la herida provocada en sus tejidos.

A partir de la **hora 9** de almacenamiento, comenzaron a mostrarse diferentes comportamientos entre los distintos tratamientos, en donde la aplicación DS+AC presentaba un color muy brillante, incluso lonchas que poseen zonas más claras que el resto del tejido superficial como una especie de blanqueamiento. Además su superficie se encontraba muy húmeda y un tacto muy firme, destacando sobre todo por el olor a sulfitos desagradable que desprendían las muestras.

Para el caso de las muestras tratadas con 5%TV, incluidas las tratadas con ácido ascórbico, el color fue ligeramente más intenso que para el resto de tratamientos, pudiendo deberse a que el extracto de té verde era oscuro y se evidenció con valores más elevados de  $a^*$ , lo que concuerda con los resultados instrumentales del color.

Esta intensificación fue superior en las muestras tratadas únicamente con 5%TV debido probablemente a que la adición del ácido orgánico homogeneizó esa diferencia. En general estos tres tratamientos poseían una apariencia buena, conservando el olor característico de la patata.

A pesar de que la muestra control presentaba en sus bordes signos de pardeamiento, en su superficie comenzaba a detectarse una especie de polvo blanquecino, es decir, almidón, que hizo que sus coordenadas  $a^*$  y su luminosidad aumentaran con respecto al resto de muestras y por lo tanto, a nivel instrumental pareciese tener mejor apariencia que el resto.

Tras **24 horas** de almacenamiento, los cambios en la apariencia de las muestras fue muy evidente, en donde el tratamiento con DS+AC siguió manteniendo la superficie de las lonchas húmedas, con un color brillante y con zonas blanquecinas, sobre todo en los bordes, creando una especie de halo pálido alrededor de la loncha que dejaba zonas más oscuras en el interior, de ahí que a nivel instrumental para esta hora este tratamiento tuviese el máximo valor de  $a^*$ .

Las lonchas tratadas con 5%TV, incluidas con AA, sobre todo el tratamiento de 5%TV+2,5%AA, mostraron una apariencia global mediocre, con tonalidades muy amarillentas o marronáceas, en cuyos bordes de su superficie se estaba empezando a desarrollar pardeado. Los depósitos de almidón se mostraban más intensos en las lonchas con la solución de 5%TV, sin embargo, cuando se aplicó el ácido orgánico, estos depósitos no eran apreciables.

Las muestras control perdieron toda la humedad, y por lo tanto la turgencia, encontrándose su superficie totalmente seca con signos muy evidentes de pardeamiento, pero sin ningún olor característico. En general poseían mala apariencia tras 24 horas de almacenado.

Tras **48 horas** almacenadas en una estufa de convección a  $25\pm 1$  °C y una 75% H.R, las muestras control dejaron de ser aceptables, presentando un pardeamiento marrónáceo marcado y con los depósitos de almidón muy pronunciados (sobre todo en la cara inferior), haciendo que la coordenada a\* presentara los valores más bajos.

Las lonchas se encontraban con una deshidratación general, haciendo su superficie muy blanda. En cuanto al olor no se detectó nada extraño, pero lo que si se notó es que al abrir la estufa el olor general no era agradable, sino cierto olor ha fermentado.

En la aplicación de DS+AC destacó que su superficie se encontraba muy pegajosa, dando indicios de la aparición de mohos y se detectó un ligero cambio en su coloración, apareciendo zonas pardeadas puntuales pero muy marcadas, y sin embargo, otras zonas totalmente blancas y brillantes. El olor se volvió completamente desagradable y su textura comenzaba a hacerse blanda, pudiéndose doblar sin romperse.

Las lonchas tratadas con 5%TV presentaban una pérdida de humedad muy importante que fue avanzando según lo hacia el almacenamiento, haciendo que su superficie fuese muy blanda. Se encontraron zonas pardeadas, pero en general el color, se mantuvo constante respecto a la hora 24, sin grandes cambios, con zonas pardeadas en los bordes, lo que no fue fácilmente registrable instrumentalmente.

Por ultimo para el caso de las muestras tratadas con TV+AA, destacaba que su superficie era más rígida y firme que para el caso de las muestras con 5%TV, posiblemente debido a la acción generada por el ácido ascórbico, además de no presentar ningún tipo de olor.

Ambos tratamientos seguían la misma línea de pardeamiento que para el caso de 5%TV, es decir, en los bordes se acentuaban las coloraciones marrónáceas, y a lo largo de la superficie de toda la loncha (sobre todo en los bordes) los depósitos de almidón estaban muy marcados, presentando peor apariencia el tratamiento con 2,5%AA y una textura más blanda que para 1,5%AA.

Después de analizar los resultados de este ensayo de almacenamiento, no se pudieron sacar conclusiones claras por diferentes motivos, entre los que se encontraban el estado de madurez de la patata, que como se dijo anteriormente era muy temprana, de nueva temporada, joven y que no había sufrido ningún tipo de almacenamiento en comparación con otras patatas.

A pesar de todo ello, la aplicación de 5%TV posee un potencial antipardeante lo suficientemente fuerte para mantener a las lonchas con el color más constante a lo largo del almacenamiento, sin mostrar olores extraños en las condiciones establecida.

Este potencial pareció verse reforzado con la combinación de 1,5% de ácido ascórbico, que además de mantener un color más constante que el resto de tratamientos, hizo que los depósitos de almidón fuesen despreciables en comparación a cuando se aplicaba 5%TV únicamente, además de presentar una superficie más rígida y firme gracias a la acción del ácido orgánico.



## *5. CONCLUSIONES*

## 5. CONCLUSIONES

---

Una vez analizados todos los resultados obtenidos sobre el potencial antipardeante de los compuestos seleccionados como el extracto de té verde, el ácido cítrico y el ácido ascórbico, tanto su combinación como su efecto individual sobre la patata mínimamente procesada cv. *Monalisa*, se exponen las conclusiones más importantes.

En cuanto al estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática y el efecto sobre la capacidad de inhibición del té verde sobre la PPO de patata cv. *Monalisa* se puede concluir que:

- A medida que se aumentaba el pH a partir de 4,5, la velocidad de reacción de la enzima comenzaba a crecer haciendo que la PPOp en cv. *Monalisa* estableciese su actividad óptima en un pH de 6,5, es decir, en ese momento la enzima presentó una alta actividad estando en presencia de exceso de sustrato y dando lugar a productos de reacción a la máxima velocidad.
- El extracto de té verde a una concentración del 5% pareció seguir la misma evolución que la actividad enzimática de la PPOp, es decir, a menor pH, menor actividad y menor capacidad de inhibir la enzima, pero conforme aumentaba este parámetro se iba consiguiendo un mayor porcentaje de inhibición hasta llegar a un máximo del 74,19% al pH óptimo (6,5), donde se producía la mayor actividad de la enzima en las condiciones establecidas.

En la evaluación de la actividad antioxidante y el contenido total en fenoles de las soluciones antipardeantes seleccionadas se observó que:

- Los tratamientos de las combinaciones de TV+AA debido a su naturaleza antioxidante presentaron los valores mayores de AAox, en donde a medida que aumentaba la concentración del AA, la actividad antioxidante ascendía, presentando un máximo de 284254,10  $\mu\text{mol ET/ml}$  solución para 5%TV+5%AA, además se pudo observar que la AAox de dicha combinación era muy similar a la que producía el AA individualmente, lo que significa que la AAox de ambos

compuestos no produce un efecto sinérgico o no resultó muy evidente en las condiciones establecidas.

- El contenido total de fenoles aumentó con la adición de ácido cítrico al té verde, registrando un valor de 241,59 mg EAG/ml solución para un 5%TV+2%AC en comparación con 205,29 mg EAG/ml solución que presentó el TV, pudiendo deberse a que el ácido orgánico realice una cierta hidrólisis en los componentes del té que los libera en la solución y se encuentren presentes en la medición.

En cuanto a la determinación de la capacidad de inhibición de los tratamientos antipardeantes seleccionados sobre la PPOp se vio que:

- La aplicación de AA individualmente dio lugar a %IPPOp superiores al 90% *in vitro* para cualquiera de sus concentraciones en las condiciones establecidas, pero su aplicación de forma individual no resulta interesante en productos mínimamente procesados en donde se pretende alargar la vida útil de estos, ya que su efecto es temporal y acaba por agotarse, oxidándose durante el proceso de reducción y permitiendo el pardeamiento enzimático. Debido a ello se suele usar en combinación con algún otro agente antipardeante.
- Las soluciones de AC en solitario para cualquiera de sus concentraciones en PMP no resultó interesante ya que los resultados sobre el %IPPOp mostraron resultados más bajos que los ofrecidos por el tratamiento de referencia de ETV.
- Las soluciones aplicadas de TV+AA mostraron un efecto inhibitorio elevado con valores superiores al 80% para cualquiera de sus concentraciones *in vitro*, en donde a medida que aumentaba la concentración disminuía el %IPPOp hasta un valor de 80,61% para 5%TV+5%AA.
- La aplicación de TV+AC no mejoró los resultados de referencia, estando en todo momento por debajo de ellos incluso se registraron valores de %IPPOp inferiores a cuando el ácido orgánico se encontraba en solitario, quizás debido a que la bajada de pH que generó el ácido fue tan elevada, que afectó a los compuestos con poder inhibitorio de la composición del ETV, por lo que su

aplicación futura sobre PMP se descartó ya que los resultados, en estas condiciones, no fueron aceptables.

En cuanto a la evaluación del efecto de los agentes antipardeantes sobre el control del pardeamiento en PMP (5%TV+1,5%AA, 5%TV+2,5%AA, 5%TV, 0,1%DS+0,5%AC y el control) se puede concluir que:

- La aplicación de TV mantuvo una coloración constante a lo largo del almacenamiento mostrando las menores variaciones de color, a pesar que tras la inmersión de las lonchas en la solución, la luminosidad descendió y aumentó la coordenada  $a^*$  debido a la propia coloración amarillenta del extracto de té que se mantuvo durante las 48 horas de almacenamiento. Además, las soluciones aplicadas de TV y TV+AA no mostraron olores extraños durante el almacenamiento como ocurría con el caso del disulfito.
- En general la adición de AA aumentó la coordenada  $L^*$  en comparación con el TV, en donde la solución antipardeante de 5%TV+1,5%AA mostró valores más altos de luminosidad, incluso para ciertas horas dicha combinación tenía los valores máximos de todos los tratamientos, lo que indicó que la adición de 1,5%AA al TV mejoró los resultados de color sobre las lonchas de PMP para las condiciones establecidas, además de mostrar los depósitos de almidón menos marcados que para el caso de la aplicación de TV individual, el disulfito y el control.
- La concentración de AA más adecuada junto con un 5%TV, fue la de 1,5% en comparación con 2,5%AA, en donde se registró una peor apariencia tras 24 de almacenamiento debido a la aparición de pardeamiento en los bordes, una textura más blanda, los depósitos de almidón más marcados y una mayor sequedad superficial.

Para trabajos posteriores en un ensayo *in vivo* sería interesante realizar el mismo estudio pero con las condiciones de almacenamiento reales de la PMP: en

refrigeración a 4 °C, envasadas en bolsas protectoras que permitan observar mejor la evolución de las muestras y sus diferencias entre tratamientos y durante un tiempo de 14 días, de esta manera se podrá observar en otras condiciones, la capacidad de control del pardeamiento de los tratamientos y la comparar con otros estudios realizados.

## *6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

---

## 6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). Tecnología para Packaging. Tecnología para IV y V gama. *Especial monográfico revista Alimentaria: investigación, tecnología y seguridad*. Marzo 2012.

Ahvenainen, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 179-187.

Almajano, M.P., Carbó, R., López-Jiménez, J.A., Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.

Alzamora, S.M., Tapia, M.S., Welte-Chanes, J. (1998). New strategies for minimally processed food. The role of multitarget preservation. *Food Science and Technology International*, 4, 353-361.

AOAC (2000). Official methods of analysis, 17<sup>th</sup> edition. *Association of official Analytical Chemists*, Washington, D.C (USA).

Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633-636.

Bobo, G., Arroqui, C., Vírseda, P. (2009). Comparative study of different antibrowning treatments in fresh-cut potato (Monalisa cv.). *VI International Symposium on Food processing, monitoring technology in bioprocesses and Food quality management*. Potsdam, Germany.

Bobo, G. (2014). Estudios de estrategias para la conservación de patatas (cv. *Monalisa*) mínimamente procesadas. Tesis Doctoral (en depósito). Departamento de Tecnología de los Alimentos. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra.

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M.R., Navarro, M. (2014). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison

with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Publicación online, en el enlace: <http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/doi/10.1002/jsfa.6706> Julio 2014.

Burton, W.G. (1967). *The Potato. Ditton Laboratory of the Agricultural Research Council*, Larkfield, Maidstone, Kent, England. H. Veenman & Zonen N.V., P.O., Wageningen, The Netherlands.

Buta, J.G., Moline, H.E. (2001). Prevention of browning of potato slices using polyphenoloxidase inhibitors and organic acids. *Journal of Food Quality*, 24, 271-282.

Cabezas-Serrano, A.B., Amodio, M.L., Cornacchia, R., Rinaldi, R., Colelli, G. (2009). Suitability of five different potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) to be processed as fresh-cut products. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 138-144.

Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R. (2006). Beneficial effects of Green tea – A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25, nº2, 79-99.

Calder, B.L., Kash, E.A., Davis-Dentici, K., Bushway, A, A. (2011). Comparison of sodium acid sulfate to citric acid to inhibit browning of fresh-cut potatoes. *Journal of Food Science*, 76, nº3, 164-169.

Cantos, E., Tudel, J.A., Gil, M.I., Espín, J.C. (2002). Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3015-3023.

Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P., Cappelloni, M. (2002). Modulation of antioxidant compounds in organic vs. conventional fruit (Peach, *Prunus persica* L., AND Pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5458-5462.

Cho, Y.K., Ahn, H.K. (1999). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 577-592.

CODEX STAN 192-1995. Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios.



Diferentes variedades de patata *Solanum tuberosum*. En el enlace: <http://factsanddetails.com/world/cat54/sub343/item1578.html>. Abril 2014.

Duangmal, K., Apenten, R.K.O. (1999). A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Food Chemistry*, 64, 351-359.

Eidhin, D.N., Degn, P., O'Beirne, D. (2010). Characterization of polyphenol oxidase from rooster potato (*Solanum tuberosum* cv *Rooster*). *Journal of Food Biochemistry*, 34, 13-30.

Erol, N.T. (2013). Determination of phenolic compounds from various extracts of green tea by HPLC. *Asian Journal of Chemistry*, 25, nº7, 3860-3862.

Essa, H.A., Nadir, A-E.S., Hamad, K.I. (2004). Effect of anti-browning and anti-microbial constituents of some spices on the quality and safety of apple slices. *Modeling, Measurement and Control C*, 64, 15-33.

FAO (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Producción de patata mundial, año 2013. En el enlace: <http://www.fao.org>. Abril 2014.

Friedman, M., Kim, S.Y., Lee, S-J., Han, J.S., Lee, K.R., Kozukue, N. (2005). Distribution of catechins, theaflavines, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States. *Journal of Food Science*, 70, 550-559.

García, E., Barret, D.M. (2002). Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. *Fresh-Cut Fruits and Vegetable: Science, Technology and Market*. Florida (USA), 268-303.

González, M. (2013). Conservación de alimentos mínimamente procesados. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. En el enlace: <http://es.slideshare.net/monicaglezlez/conservacin-alimentos-mnimamente-procesados> Abril 2014.

Gunes, G., Lee, C.Y. (1997). Color of minimally processed potatoes as affected by modified atmosphere packaging and antibrowning agents. *Journal of Food Science*, 62, nº3, 572-575.

Hernández, C.E. (2009). Acción y efectos de la polifenoloxidasa en alimentos. Tesis Doctoral. Química Industrial. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana (México).

Hwang, T.Y., Son, S.M., Moon, K.D. (2002). Screening of effective browning inhibitors on fresh-cut potatoes. *Food Science and Biotechnology*, 11, nº4, 397-400.

Ierna, A., Melilli, M.G. (2014). Ascorbic acid and total phenolics content in early potatoes as affected by browning season, genotype and harvest time. *III<sup>rd</sup> IS on Human Health Effects of Fruits and Vegetables*. Avignon (France).

Iyengar, R., Bohmont, C.W., McEvily, A.J. (1991). 4-Hexylresorcinol and prevention of shrimp blackspot: residual analyses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4, 148-157.

Kahn, V. (1977). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *Journal of Food Science*, 42, 38-43.

Lamikanra, O. (2002). Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market. *Library of Congress*. Florida (USA).

Landi, M; Innocenti, E.D., Guglielminetti, L., Guidi, L. (2013). Role of ascorbic acid in the inhibition of polyphenol oxidase and the prevention of browning in different browning-sensitive *Lactuca sativa* var. *capitata* (L.) and *Eruca sativa* (Mill.) stored as fresh-cut produce. *Journal of Food Science*, 93, 1814-1819.

Laurila, E.K., Hurme, E.U., Ahvenainen, R.T. (1998). Shelf life of sliced raw potatoes of various cultivar varieties substitution of bisulfites. *Journal of Protection*, 61, nº 10, 1363-1371.

Lin, M., Ke, L-N., Han, P., Qiu, L., Chen, Q-X., Lin, H-T., Wang, Q. (2010). Inhibitory effects of *p*-alkylbenzoic acids on the activity of polyphenol oxidase from potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 119, 660-663.

Ma, Y., Wang, Q., Hong, G., Cantwell, M. (2010). Reassessment of treatments to retard browning of fresh-cut *Russet* potato with emphasis on controlled atmospheres and low concentrations of bisulphite. *Food Science and Technology*, 45, 1486-1494.

MAGRAMA 2014 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). Datos de consumo alimentario en España 2013. Abril 2014.

Manzanos, A (2010). Determinación del efecto del hielo líquido en las operaciones de enfriado tras el shock térmico y el tratamiento con antipardeantes. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra.

Martín-Diana, A.B., Rico, D., Barry-Ryan, C. (2008). Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 9, 593-603.

Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitor from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemical*, 69, nº1, 197-201.

Mayer, A.M (1987). Polyphenol oxidases in plants. *Recent Progress Phytochemistry*, 26, 11-20.

McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 253-273.

McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 49, 183-186.

Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Cavalieri, R.P., McEvily, A.J., Iyengar, R. (1993). Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-Hexylresorcinol as anti-browning agent. *Journal of Food Science*, 58, 797-800.

Mosneaguta, R., Alvarez, V., Barringer, A. (2012). The effect of antibrowning agents on inhibition of potato browning, volatile organic compound profile and microbial inhibition. *Journal of Food Science*, 77 nº11, 1234-1240.

Nirmal, N.R., Benjakul, S. (2012). Effect of Green tea extract in combination with ascorbic acid on the retardation of melanosis and Quality changes of pacific White shrimp during iced storage. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2941-2951.

Pardo, J.E., Alvarruiz, A., Pérez, J.I., Gómez, R., Varón, R. (2000). Physical-chemical and sensory Quality evaluation of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Quality*, 23, 149-160.

Parzanese, M. (2010). Vegetales mínimamente procesados. Tecnologías para la Industria Alimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Alimentos Argentinos. En el enlace: [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_11\\_Vegetales.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_11_Vegetales.pdf). Abril 2014

Pooaiah, B.W. (1986). Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. *Food Technology*, 86-89.

Pruidze, G.N., Grigorashvili, G.Z. (1977). Extraction and properties of an inhibitor of o-diphenoloxidase and peroxidase from tea leaf. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 13, 76-81.

REAL DECRETO 1118/2007.BOE.Núm 221, que modifica el REAL DECRETO 142/2002. Lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

REGLAMENTO (UE) 1129/2011. Lista de aditivos alimentarios de la Unión Europea autorizados para ser empleados en aditivos alimentarios, enzimas alimentarias, aromas alimentarios y nutrientes.

Reyes-Moreno, C., Parra-Inzunza, M.A., Milán-Carrillo, J., Zazueta-Niebla, J.A. (2001). A response surface methodology approach to optimize pretreatments to prevent enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) cubes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 69-79.

Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 373-386.

Rocha, A.M.C.N., Morais, A.M.M.B. (2003). Shelf life of minimally processed apple (cv. *Jonagored*) determined by colour changes. *Food Control*, 14, 13-20.

Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008). Effect of natural antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut *Fuji* apples as an alternative to use of ascorbic acid. *Journal of Food Science*, 73, nº6 267-272.

Rousselle, P.; Robert, Y., Crosnier, J. C. (1999). La patata. *Ediciones Mundi-Prensa*. Madrid, España. 607 p.

Sapers, G., Miller, R.L. (1992). Enzymatic browning in potato with ascorbic acid-2-phosphates. *Journal of Food Science*, 57, nº5, 1132-1135.

Sayavedra-Soto, L.A, Montgomery, M.W. (1986). Inhibition of polyphenoloxidase by sulphite. *Journal of Food Science*, 51, 1531-1536.

Soysal, Ç. (2009). Effects of Green tea extract on *Golden Delicious* Apple polyphenoloxidase and its browning. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 134-148.

Trujillo, Y.Y. (2004). Optimización del uso de agentes conservantes, en la mejora de la calidad y la vida útil de patata cv. *Monalisa* mínimamente procesada. Tesis Doctoral. Área de Tecnología de los Alimentos, Universidad Pública de Navarra.

Trujillo, Y.Y., Villamizar, N., Durán, D. (2013). Characterization of the polyphenoloxidase in three varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) minimally processed and its color effect. *Alimentech Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 11, nº1, 5-12.

Vámos-Vigyázó. (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, nº1, 49-127.

Vitti, M.C.D., Sasaki, F.F., Miguel, P., Kluge, R.A., Moretti, C.L. (2011). Activity of enzymes associated with the enzymatic browning of minimally processed potatoes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, nº5, 983-990.

Wang, H., Provan., G.J., Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science and technology*, 11, 152-160.

Watada, A.E., Qi, L. (1998). Quality of fresh-cut produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 201-205.

Whitaker, J.R., Lee, C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. Washington, DC: *American Chemical Society*, p 2-7.

Wiley, R.C (1997). Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. *Chapman & Hall, Inc.* One Peen Plaza. New York (USA).