



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

## **DESHIDRATACIÓN DE CIRUELAS ASISTIDA POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV)**

Autor:

**Irene Crespo Casado**

Directores:

**Ignacio Álvarez Lanzarote**

**Javier Raso Pueyo**

Facultad de Veterinaria

Junio 2015

## **DATOS PERSONALES**

- **Apellidos:** Crespo Casado
- **Nombre:** Irene
- **DNI:** 77216438 X
- **Dirección:** C/ Simón Sainz de Varanda 22, 5°C. 50007 - Zaragoza
- **Teléfono:** 653548423
- **Correo electrónico:** irenec49@hotmail.com

## ÍNDICE

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
  - 2.1 Ciruelas deshidratadas o secas
  - 2.2 Proceso de deshidratación
  - 2.3 Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV)
    - 2.3.1 Aspectos técnicos del tratamiento de PEAV
    - 2.3.2 Aplicación de los PEAV en la industria alimentaria
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO
4. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 4.1 Materia prima
  - 4.2 Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV)
  - 4.3 Determinación del Índice de Desintegración Celular (IDC)
  - 4.4 Cuantificación del líquido intracelular extraído por centrifugación
  - 4.5 Deshidratación
  - 4.6 Medida de la velocidad del aire en las estufas de secado
  - 4.7 Rehidratación de las muestras
  - 4.8 Descripción de las curvas de deshidratación con modelos matemáticos
  - 4.9 Análisis de datos
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
  - 5.1 Determinación de las condiciones óptimas de electroporación de las ciruelas
    - 5.1.1 Evaluación de los PEAV en el Índice de Desintegración Celular
    - 5.1.2 Evaluación de los PEAV en el líquido intracelular extraído por centrifugación
    - 5.1.3 Relación entre el IDC y el líquido intracelular extraído por centrifugación
  - 5.2 Influencia de la aplicación de los tratamientos PEAV en las curvas de deshidratación de ciruelas obtenidas a distintas temperaturas.
  - 5.3 Optimización del tratamiento PEAV para deshidratación de ciruelas a baja temperatura
  - 5.4 Rehidratación de las ciruelas
6. CONCLUSIONES,
7. APORTACIONES Y VALORACION DE LA ASIGNATURA
8. BIBLIOGRAFÍA

## 1. RESUMEN

Las frutas desecadas, son alimentos concentrados en nutrientes (tienen alta cantidad de vitaminas, minerales y fibra), por lo que son una alternativa interesante para personas de todas las edades si son consumidas de forma moderada. El problema es que los procesos más empleados para la deshidratación utilizan aire a altas temperaturas que puede producir daños en estos nutrientes así como afectar a la calidad sensorial del alimento. Es por ello que resultaría interesante poder deshidratar las frutas a menores temperaturas para afectar lo menos posible a su calidad.

Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) son una tecnología que produce la permeabilización de las envolturas celulares facilitando la salida del agua intracelular, por lo que podría ser un pre-tratamiento previo a la deshidratación que podría permitir disminuir la temperatura de deshidratación.

Por eso, el objetivo de esta investigación se ha centrado en evaluar el efecto de la permeabilización en la membrana de ciruelas enteras que provocan distintos tratamientos PEAV mediante procesos de deshidratación con aire caliente.

Como materia prima se usaron ciruelas enteras a las que se aplicaron diferentes tratamientos PEAV en función de las temperaturas usadas (30, 50, 70 y 90 °C). Los tratamientos PEAV aplicados se definieron entre aquellos que permitieron conseguir un mayor grado de permeabilización de las células (medido por el índice de desintegración celular y la cantidad de líquido extraído por centrifugación) con el menor coste energético de los tratamientos PEAV.

Con los datos obtenidos, se construyeron gráficas de deshidratación que se describieron con un modelo matemático con las que se pudo cuantificar y comparar el efecto de los tratamientos PEAV y las temperaturas de deshidratación en los tiempos y velocidades de deshidratación.

La permeabilización de las células de las ciruelas tratadas por PEAV aumentó significativamente la velocidad de deshidratación de las mismas, pudiéndose reducir el tiempo y la temperatura necesarios para su completa deshidratación. Por ejemplo, el tratamiento de de 4 kV/cm-10 pulsos permitió reducir el tiempo de deshidratación 3 y 2 veces a 30 y 50°C, respectivamente, con respecto a las ciruelas control con un consumo energético extra de tan solo 0,26 kJ/kg por el tratamiento PEAV.

## **ABSTRACT**

Dried fruits are highly concentrated nutrients nourishment (containing high amounts of vitamins, minerals and fiber), that being the reason why they offer an interesting alternative for wide age range individuals, if consumed moderately. The main issue is that the most used processes for the dehydration of fruits, use a extremely hot air, susceptible to affect the nutrients and the organoleptic properties of plums. That's the reason why being able to dehydrate fruits using lesser temperatures may be an interesting option, in order to achieve the tiniest damage to the product quality.

PEF are a new technology that produces the electroporation of cells providing the intracellular water way out, this fact allowing it to be a pre-treatment shall to be applied prior to the dehydration with hot air.

That's the reason why the main object in this study has focused in assess the effect of different PEF treatment using dehydration with hot air.

Plums were used as a raw material, being treated at different temperatures (30, 50, 70 and 90°C). Electric fields strengths were chosen between those that allowed reaching high values in electroporation cells (measuring that results with IDC and the amount of liquid extracted by centrifugation) using less energy.

Dehydration graphics were built using the obtained results and described through a mathematic model, in order to quantify and compare the effect of PEF and dehydration temperatures with dehydration time and speed.

Electroporation degree of plums treated with PEF increased meaningfully the dehydration speed, achieving the reduction of temperature and dehydration time. As an example, 4 kV/cm-10 pulses treatment allowed to reduce dehydration time 3 and 2 times at 30 and 50°C, respectively, in comparison to control plums, resulting in an additional energy cost of just 0,26 kJ/kg, through PEF treatment.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Ciruelas deshidratadas o secas**

Las ciruelas secas son productos obtenidos por deshidratación de las ciruelas enteras. Deben tener un grado de humedad del 23% como máximo y por 500 gramos de ciruelas secas debe haber un número de frutos inferior a 105 (Reglamento (CE) n° 464/1999).

El producto final tiene una vida útil más larga que la que tendría la fruta fresca y un peso mucho menor debido a que se reduce su actividad de agua hasta valores de 0,65-0,68 mediante la eliminación de agua, aumentándose por ello su concentración en solutos, y limitándose el efecto de los agentes de alteración, en especial los microorganismos (Newman *et al.*, 1996).

De forma general, la deshidratación industrial de las ciruelas se realiza en túneles de secado a temperaturas del aire de deshidratación elevadas (80-90°C) y tiempos largos, que en ocasiones pueden llegar a las 36 horas según los volúmenes de producción, para conseguir que se mantengan al máximo las propiedades sensoriales y nutritivas de esta fruta. Hay estudios que incluso reducen los tiempos de deshidratación a temperaturas de unos 80°C a tan sólo 45 minutos con el fin de minimizar las pérdidas de calidad, tiempo que está condicionado por el calibre de las ciruelas (Urfalino y Worlock, 2014). Una vez deshidratadas, y antes de su comercialización, se les aplica una etapa de “tiernizado” que consiste en una rehidratación con vapor o agua caliente (90°C durante 30-50 minutos) hasta llegar a una humedad del 28-30% con el propósito de suavizar la pulpa y hacerla más agradable al paladar al momento de consumirla (Urfalino, 2013).

### **2.2 Proceso de deshidratación**

La deshidratación es una operación de la industria alimentaria que tiene como objetivo eliminar la mayor parte del agua contenida en un alimento por evaporación mediante la aplicación de calor bajo condiciones controladas.

El secado de los alimentos es el método más antiguo de conservación de los productos perecederos, y se basa en la reducción del agua disponible para los agentes de alteración mediante su evaporación hasta niveles de humedad entorno al 2% (Casp *et al.*, 2003). La industria alimentaria utiliza la deshidratación como método de conservación de un gran número de productos, entre los que encontramos los productos lácteos y derivados,

productos derivados de los cereales, frutas, etc. También se aplica para reducir el peso y volumen de los alimentos (lo que abarata los costes de almacenaje y transporte) y para facilitar el empleo y diversificar la oferta de productos.

La mayoría de los procesos de deshidratación se caracterizan porque el alimento se pone en contacto con una corriente de aire caliente de modo que el calor requerido para eliminar el agua se aporta al alimento principalmente por convección. Menos frecuente es la desecación de los alimentos por contacto directo con una superficie caliente en el que el calor se aporta al producto principalmente por conducción.

La deshidratación es un proceso complejo que implica procesos de transferencia de masa y calor (Shenma *et al*, 2003). El agua se elimina de los alimentos por medio de su difusión en fase líquida y/o vapor a través de su estructura interior. Al movimiento del agua en estado líquido le sigue su evaporación en algún punto del alimento, para la cual es necesario calor. Por lo tanto, el proceso supone un transporte simultáneo de materia y calor.

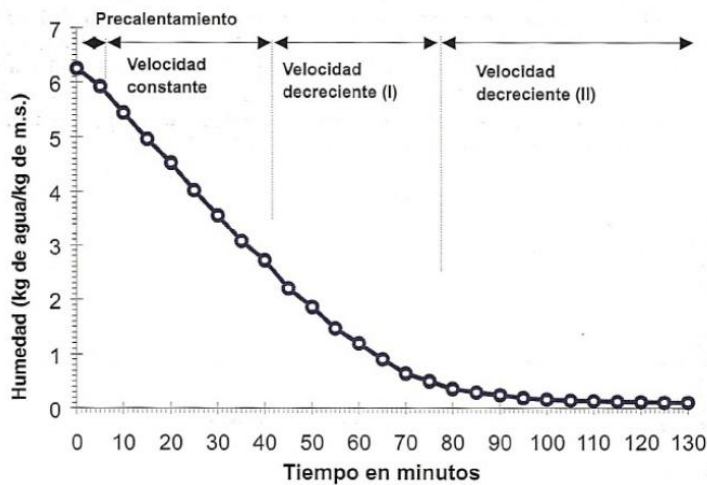
La evolución de la humedad de un alimento a lo largo del tiempo de secado se muestra en la Figura 1 (Casp *et al*, 2003), donde se pueden distinguir las siguientes etapas:

- Un periodo de precalentamiento, que transcurre mientras el producto y el agua en él contenida se calientan ligeramente, hasta alcanzar la temperatura del bulbo húmedo característica de ambiente secante. La velocidad de transferencia de masa es muy lenta, pero el gradiente de temperatura entre el aire caliente y la superficie del alimento es elevada y, por lo tanto, la transferencia de calor es también alta. Este periodo es muy corto en comparación con el tiempo total de secado.

- Un periodo de velocidad constante, durante el cual se produce una reducción del contenido de agua importante. La evaporación se efectúa en la superficie del producto, a temperatura constante, siendo ésta la del bulbo húmedo del aire. Este periodo continúa mientras que la superficie del producto esté alimentada por agua libre líquida desde el interior, fundamentalmente por capilaridad. El flujo de agua líquida arrastra solutos que se depositan en la superficie, si no son volátiles, produciendo el fenómeno de encostrado. Generalmente, esta etapa finaliza cuando el contenido medio de humedad del producto alcanza la humedad crítica. Cuando la superficie externa del producto deja de estar saturada de agua, comienzan uno o varios periodos de velocidad de secado

decreciente y la temperatura se incrementa continuamente desde la del bulbo húmedo hasta la del fluido calefactor.

- Periodo de velocidad decreciente que comienza cuando la superficie del producto en contacto con el aire de secado alcanza el umbral de higroscopicidad (alcanza la humedad crítica). La zona de evaporación o “frente de secado” se desplaza desde la superficie al interior del producto. La migración del agua es cada vez más difícil y como consecuencia la transferencia de masa se convierte en el factor limitante. La velocidad de deshidratación en este periodo de secado está limitada principalmente por la velocidad de movimiento de la humedad dentro del sólido, siendo menos importantes los efectos de los factores externos, en especial la velocidad del aire.



**Figura 1.** Curva de deshidratación.

La temperatura y la velocidad del aire son los dos principales parámetros que influyen en el proceso de deshidratación de un alimento. En general, la velocidad de deshidratación aumenta con ambos parámetros siendo más importante el efecto de la temperatura en la reducción del tiempo de deshidratación. Por ejemplo, en un estudio sobre la deshidratación de arándanos se observó que un aumento de la temperatura de secado de 85°C a 107°C reducía el tiempo de secado a la mitad mientras que para reducirlo alrededor del 30% el tiempo de secado a 85°C fue necesario aumentar alrededor de 100 veces la velocidad del aire (desde 0,4 m/s hasta 45 m/s) (Yemmireddy et al, 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la temperatura de deshidratación puede tener influencia en las propiedades sensoriales y nutritivas del producto. Elevadas temperaturas y velocidades de deshidratación suelen provocar que los productos



deshidratados tengan una mayor dureza y una peor rehidratación por la formación de una corteza en la superficie, por lo que se consideran como “productos diferentes o nuevos”. Es por ello que actualmente se están buscando nuevas tecnologías de procesado que por sí solas o combinadas con el secado tradicional de los alimentos permitan aumentar la velocidad de deshidratación, y reducir el tiempo y temperatura de secado para así reducir el coste energético del proceso (4-6 MJ/kg) y minimizar la degradación de nutrientes y de las propiedades sensoriales del producto debidas a la aplicación de calor (Ade-Omowaye et al., 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación de microondas durante el proceso de secado reduce significativamente el tiempo de secado lo que conlleva importantes ahorros de energía (Feng, 2002). Otra de las tecnologías que se está investigando con tal fin es la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje que es el tema de estudio de este trabajo.

### **2.3 Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje**

El tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) consiste en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad ( $>0,5$  kV/cm) y corta duración (del orden de mili a microsegundos) a un producto colocado entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas y col., 2001). Este tratamiento provoca cambios estructurales en las membranas celulares de células tanto procariotas como eucariotas, formando poros, lo que se traduce en un aumento de su permeabilidad al paso de moléculas e iones, denominándose el proceso electroporación.

Uno de los modelos más aceptados para explicar la electroporación de la membrana plasmática es la “Teoría de la inestabilidad electromagnética” (Zimmermann y col., 1974; Zimmermann, 1986). Según esa teoría, al someter una célula a la acción de un campo eléctrico externo se produce un acúmulo de iones con cargas eléctricas de signo contrario a ambos lados de la membrana. Las fuerzas de atracción electrostáticas que se establecen entre las cargas provocan la compresión de la membrana y la formación de poros cuando éstas superan el límite de elasticidad de la membrana.

La electroporación de la membrana puede ser reversible, de forma que los poros formados se cierran tras el tratamiento, o irreversibles si siguen permaneciendo abiertos. La permeabilización reversible se emplea en el campo de la biotecnología o de la ingeniería genética para introducir en el interior de la célula sustancias como proteínas,

ADN, etc. Sin embargo, en la industria alimentaria, las aplicaciones de esta tecnología se basan en la permeabilización irreversible de las membranas. La reversibilidad o irreversibilidad de los poros depende de diversos factores como el grosor de la membrana, la forma y el tamaño de las células o la intensidad del tratamiento aplicado. De manera general, los poros formados son reversibles si son de pequeño tamaño en comparación con el área de la membrana. Un aumento de la intensidad del tratamiento, mediante el incremento del campo eléctrico y/o el número o anchura del pulso, puede dar a la irreversibilidad de los poros formados. El campo eléctrico crítico para la irreversibilidad del tratamiento varía en función del tamaño y la forma de la célula, siendo en general aceptados entre 0,5 y 2 kV/cm para las células eucariotas como las que constituyen los vegetales y entre 10 y 15 kV/cm para las procariotas como los microorganismos (Donsi y col., 2010).

Son diversas las técnicas utilizadas para evidenciar la formación de poros en las envolturas celulares: uso de colorantes, microscopía electrónica, etc., principalmente en células procariotas. En el caso de las eucariotas, además y desde un punto de vista práctico, se suelen utilizar medidas rápidas como el Índice de Desintegración Celular (IDC), que es una medida del grado de permeabilidad celular en base a la mayor o menor facilidad al paso de una corriente eléctrica de diferente frecuencia, y la determinación de la cantidad de líquido extraído tras una centrifugación a partir de células procesadas. Estas son las técnicas utilizadas en este trabajo para determinar el grado de permeabilización celular conseguido por los tratamientos y que se describirán con más detalle posteriormente.

### **2.3.1 Aspectos técnicos del tratamiento de PEAV.**

Los parámetros principales que definen los tratamientos de PEAV son la intensidad del campo eléctrico, la anchura del pulso, el número de pulsos, el tiempo de tratamiento y la energía específica.

Intensidad del campo eléctrico: Se define como la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos donde se coloca el alimento dividido por la distancia que los separa:

$$E = \frac{V}{d}$$

donde  $E$  es el campo eléctrico aplicado,  $V$  el voltaje aplicado entre los dos electrodos, y  $d$  la distancia que los separa. Se suele expresar en kV/cm.

Forma y anchura del pulso ( $\tau$ ): En la actualidad, en los tratamientos de pulsos eléctricos se emplean esencialmente dos tipos de pulsos: los de caída exponencial y los de onda cuadrada. Los pulsos de caída exponencial se producen por la descarga completa y no regulada de los condensadores del equipo PEAV, lo que provoca un rápido incremento del voltaje y su posterior descenso exponencial a lo largo del tiempo, aspecto este que dificulta la medida del tiempo de tratamiento. Por otro lado, los pulsos de onda cuadrada se caracterizan porque tras un rápido incremento del voltaje este se mantiene constante durante un periodo de tiempo y, finalmente, cae de nuevo rápidamente. Por lo tanto, en este caso, la descarga de los condensadores está regulada con el fin de mantener el voltaje seleccionado constante a lo largo de toda la duración del pulso. Por ello, es preferible trabajar con los pulsos de onda cuadrada con el fin de determinar con precisión la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento aplicados.

Para poder caracterizar el pulso, hay que determinar la anchura del mismo. En los pulsos de onda cuadrada, este cálculo es inmediato y se corresponde con la duración del pulso. Mientras que en los de caída exponencial, se define como el tiempo durante el cual la amplitud del pulso es superior al 37% del máximo voltaje de descarga.

Tiempo efectivo de tratamiento ( $t$ ): Se define como el número de pulsos aplicados por su anchura ( $\tau$ ), y se expresa en mili o microsegundos según el tipo de pulsos utilizados.

Frecuencia: Es el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo. Una vez seleccionado el tiempo efectivo del tratamiento, la frecuencia determina el tiempo de permanencia del producto en la cámara de tratamiento donde se encuentra el producto, es decir, el tiempo de procesado.

Energía por pulso: Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de la cámara de tratamiento, se genera una corriente eléctrica que circula a través del producto. La energía aplicada en cada pulso se define según la siguiente ecuación:

$$W = VIt$$

donde  $W$  es la energía aplicada en el tiempo  $t$ ,  $V$  es el voltaje aplicado entre los electrodos e  $I$  es la intensidad de la corriente eléctrica.

La energía total aplicada en un tratamiento será el resultado de multiplicar la energía aplicada en cada pulso por el número de pulsos del tratamiento. Y la energía específica del pulso es el resultado de dividir la energía del pulso por la masa de la materia tratada. Multiplicando dicha energía por el número de pulsos se obtiene la energía específica total aplicada con la que es posible estimar el coste energético del tratamiento.

### **2.3.2 Aplicación de los PEAV en la industria alimentaria**

La permeabilización irreversible de las membranas de las células vegetativas de los microorganismos provoca su inactivación a temperaturas inferiores a las que se utilizan en el procesado térmico de los alimentos. Por ello, los PEAV son considerados, en la actualidad, como una de las tecnologías emergentes de pasteurización de alimentos especialmente sensibles al calor como los zumos de frutas (Toepfl., 2006).

La electroporación irreversible de las membranas celulares de los tejidos animales o vegetales se está investigando con objeto de mejorar la transferencia de masa en procesos de la industria en los que la sustancia que se transfiere tiene que atravesar la membrana citoplasmática de las células. La mayoría de las investigaciones realizadas hasta el momento se han centrado en el estudio de las ventajas de la aplicación de un tratamiento de PEAV en la extracción de distintos componentes de interés como azúcar de remolacha, betanina de remolacha roja, polifenoles, antocianos, etc. (Knorr y Angersbach, 1998; Ade-Omowaye et al., 2001; Vorobiev y Lebovka, 2006). También se ha utilizado para la elaboración de vino tinto, mejorando la extracción fenólica durante la elaboración del vino mediante el tratamiento de las uvas por PEAV antes de la etapa de fermentación-maceración (Puértolas et al. 2010). Los primeros estudios realizados en 2005 en la Universidad de Zaragoza demostraron que un tratamiento PEAV (2-10 kV/cm; 0,4-6,7 kJ/kg) a las uvas antes de la fermentación-maceración aumentaban y aceleraban la extracción fenólica en diferentes variedades como Tempranillo, Graciano, Mazuelo, Garnacha y Cabernet Sauvignon (López et al. 2008, 2009). En otro campo en el cual se está investigando el uso de los PEAV, es en la elaboración de aceites vegetales, en especial el aceite de oliva virgen. La aplicación de un tratamiento con PEAV en la pasta de aceitunas después de la molienda aumentó el porcentaje de aceite extraído en un 8,3% cuando el batido se llevó a cabo bajo condiciones de procesamiento en frío (15°C), mejorando las características sensoriales del producto. (Abenoza y col., 2012). Finalmente, también se ha estudiado el efecto de la aplicación de un tratamiento

de PEAV previo al proceso de deshidratación sobre la velocidad de deshidratación de distintas frutas y hortalizas como patatas y pimientos rojos. Un pre-tratamiento con PEAV redujo el tiempo de deshidratación convencional de un 20% a 30%, a temperaturas de deshidratación inferiores a 60°C (Ade-Omowaye et al 2000, 2003; Knorr y Angersbach 1998). Además de disminuir el tiempo de deshidratación, se observó que el tratamiento de PEAV permitía reducir la temperatura de deshidratación obteniéndose productos deshidratados con unas mejores características sensoriales (Ade-Omowaye et al. 2001).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

La temperatura y la velocidad del aire son dos de los principales parámetros que condicionan la pérdida de agua de los alimentos durante el proceso de deshidratación. De entre ellos, la temperatura es el que más influye en la velocidad de deshidratación. Sin embargo, el uso de temperaturas de deshidratación muy elevadas puede afectar considerablemente a las propiedades sensoriales de los alimentos (Muratore et al., 2008).

La mayor parte del agua contenida en los alimentos se encuentra localizada en el interior celular. Por lo tanto, en el proceso de deshidratación, la membrana de las células actúa como una barrera que dificulta el proceso de deshidratación. Los pulsos eléctricos de alto voltaje es una tecnología que provoca la electroporación de las membranas celulares facilitando la extracción de los componentes localizados en el interior de las células. Es por ello que en esta investigación se plantea la hipótesis de la aplicación de un tratamiento previo al secado con aire de pulsos eléctricos de alto voltaje que faciliten la transferencia de agua del interior celular al aire de deshidratación. Es decir que el **objetivo general** de esta investigación fue el de evaluar el efecto de la permeabilización en la membrana de las células de ciruelas enteras que provocan distintos tratamientos PEAV en procesos de deshidratación con aire caliente.

Para alcanzar este objetivo, fue necesario realizar los siguientes **objetivos parciales**:

1. Establecer las condiciones de tratamiento por PEAV que permitan conseguir la máxima electroporación de las células de la ciruela con el menor consumo energético.
2. Obtener las gráficas de deshidratación de ciruelas a diferentes temperaturas, comparando ciruelas tratadas por pulsos eléctricos de alto voltaje de distinta intensidad y ciruelas sin tratar (control).
3. Describir con modelos matemáticos las curvas de deshidratación para cuantificar el efecto de los PEAV y la temperatura en la velocidad de deshidratación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materia prima**

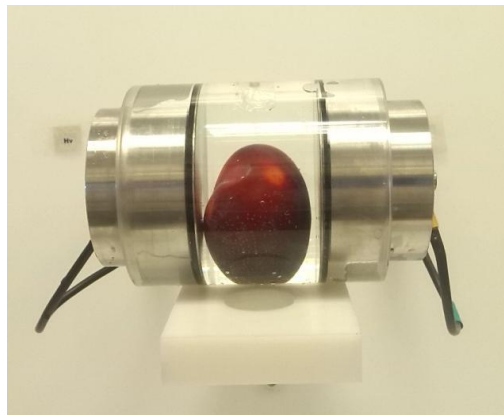
Se usaron ciruelas moradas enteras compradas en un supermercado local. Se utilizaron alrededor de 20 ciruelas para cada lote estudiado. Se entiende por lote aquellas ciruelas que han sido compradas y tratadas el mismo día y sometidas a las mismas condiciones de temperatura de secado, medida de IDC o volumen extraído por centrifugación.

### **4.2 Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV)**

El equipo PEAV que se utilizó en esta investigación (ScandiNova, Uppsala, Suecia) consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, Scandinova) que convierte la corriente trifásica alterna (380V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie. Una señal eléctrica externa (TTL, 5V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal pulsante de onda cuadrada. Finalmente, un transformador de pulsos convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada. Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3 microsegundos de duración y de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz. El control del equipo se realiza mediante un software específico diseñado por la empresa fabricante (K1-15m, Scandinova) manejable mediante una pantalla táctil de cristal líquido. Dispone de un sistema de seguridad que permite la desconexión manual del circuito eléctrico en caso de emergencia. La determinación del voltaje y amperaje aplicados se realiza mediante una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix, Wilsonville, Oregon, EE.UU.) y una sonda de amperaje (Stangenes Industries, Palo Alto, California, EE.UU.) conectadas a un osciloscopio digital (TDS 220, Tektronix).

La cámara de tratamiento utilizada consistía en dos electrodos paralelos cilíndricos macizos de acero inoxidable de 8 cm de diámetro separados una distancia de 5,5 cm por un cuerpo cilíndrico hueco de metacrilato donde se alojaba la muestra. La superficie de los electrodos estaba pulida a espejo para favorecer que la distribución del campo eléctrico en la cámara de tratamiento sea lo más uniforme posible. Uno de los electrodos se conectó a alto voltaje, mientras que el otro estaba conectado a tierra.

Para la aplicación de los tratamientos de PEAV y posterior deshidratación de las ciruelas, éstas se introdujeron en el interior de la zona de tratamiento y posteriormente la cámara se rellenó con una disolución acuosa de NaCl que tenía una conductividad de 0,55 mS/cm (Figura 4.1). Con ello, se consiguió una resistencia en la cámara de tratamiento de 100-150 $\Omega$  condiciones adecuadas para el correcto funcionamiento del equipo. Tras los correspondientes tratamientos PEAV, se realizó la determinación de la permeabilización celular por tratamientos PEAV mediante la medida de IDC y la cuantificación del líquido intracelular extraído por centrifugación.



**Figura 4.1.** Cámara de tratamiento utilizada para aplicar los tratamientos PEAV a las ciruelas.

Dependiendo de la investigación y como se indicará en cada caso, se aplicaron distintos tratamientos PEAV que variaron desde 1 a 5 kV/cm y de 10 a 50 pulsos de 3 microsegundos, lo que suponía una variación de la energía específica aplicada de 0,03 a 1,3 kJ/kg.

#### **4.3 Determinación del Índice de Desintegración Celular (IDC)**

El IDC de las ciruelas tratadas y no tratadas por PEAV se determinó usando un impedanciómetro (*DIL – Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik E.V.*, Quakenbrück, Alemania) con una cámara de medición de 2 cm de diámetro y 2 cm de longitud donde se colocaba un trozo de la muestra del mismo tamaño. El equipo aplica un potencial de 1,5 V y mide la conductividad de la muestra en un rango de frecuencias que varía desde 500 Hz hasta 5 MHz. Este equipo está conectado con un ordenador en el que se registra la curva de impedancia a partir de la cual se determina el IDC según la siguiente expresión (Ade-Omowaye y col., 2000):



$$Z_p = 1 - b \frac{(K'_h - K'_l)}{(K_h - K_l)}; 0 \leq Z_p \leq 1$$

donde  $Z_p$  es el IDC;  $b$  es  $K_h/K'_h$ ;  $K_l$  y  $K'_l$  son la conductividad eléctrica de la muestra control y la muestra tratada a baja frecuencia (5 kHz); y  $K_h$  y  $K'_h$  son la conductividad eléctrica de la muestra control y la muestra tratada a alta frecuencia (500kHz). La determinación de la impedancia se realiza con ayuda del software “Impedance Measurement” (DIL).

#### 4.4 Cuantificación del líquido intracelular extraído por centrifugación

La permeabilización de las membranas celulares de las ciruelas por la aplicación de tratamientos de PEAV se caracterizó mediante la eliminación de agua intracelular de las ciruelas por centrifugación (Jouan CR 4.11, Cedex, Francia). Una vez tratadas las ciruelas, se cortaron en dos mitades, una de ellas se cortó en tres trozos y se introdujeron dentro de una malla de red en un tubo para centrifugación con perlas de vidrio en el fondo para facilitar la separación de la parte sólida de las ciruelas de la fracción acuosa liberada por acción de la fuerza centrífuga. Una vez centrifugadas las ciruelas a 1500 rpm durante 10 minutos, se separó la parte sólida y se cuantificó la cantidad de agua eliminada por pesada (Figura 4.4). Los resultados se expresaron en porcentaje de peso del líquido extraído (gramos de líquido extraído por 100 gramos de ciruela). Varias velocidades y tiempos de centrifugación fueron investigados ya que el protocolo aplicado para otras matrices no permitía cuantificar diferencias entre las muestras procesadas o no por PEAV por esta técnica siendo que en la manipulación de las muestras sí que había claras diferencias. De todas las combinaciones evaluadas, 1500 rpm durante 10 minutos fue la que mejores resultados permitió obtener con esta técnica (datos no mostrados).



**Figura 4.4.** Tubos de laboratorio con el líquido intracelular extraído en los diferentes tratamientos PEAV y control (primer frasco de la izquierda).

#### 4.5 Deshidratación

Debido a la falta de disponibilidad de equipos, la deshidratación de las ciruelas se llevó a cabo en distintas estufas según la temperatura de deshidratación. Así la deshidratación a 30°C se realizó en la estufa Selecta Hotcold-UL (Digitronic, Barcelona); la de 50°C, en el deshidratador Sedona Rawfood (Mod. SD-P9000, California); y las de 70 y 90°C, en la estufa Selecta (Mod. 2000962). Estudios realizados y que se muestran más adelante demostraron que el rango de velocidad del aire de deshidratación (entre 0,2 y 1,0 m/s) en los diferentes equipos era similar y no afectó a las curvas de deshidratación obtenidas por lo que los resultados eran directamente comparables.

Las ciruelas se colocaban sobre una rejilla para no interrumpir el flujo del aire (Figura 4.3). A cada una de las temperaturas de deshidratación, se deshidrataban 4 ciruelas para cada una de las condiciones de tratamiento PEAV y control. A lo largo del proceso de deshidratación, las ciruelas se pesaban en una balanza analítica (Sartorius BL210S, Madrid), para determinar la pérdida de agua a lo largo del tiempo. La frecuencia de la toma de peso de las ciruelas se realizó a intervalos diferentes en función de la temperatura de tratamiento. Las gráficas de deshidratación se obtuvieron representando el peso de las muestras expresado en porcentaje a lo largo del tiempo de deshidratación.



**Figura 4.5.** Disposición de las ciruelas en una de las estufas de deshidratación.

#### 4.6 Medida de la velocidad del aire en las estufas de secado

Con el fin de determinar la posible influencia de la velocidad del aire de deshidratación en las distintas estufas, se realizó la medida de este parámetro en cada una de las posiciones en las que se colocaron las ciruelas en las distintas estufas utilizadas

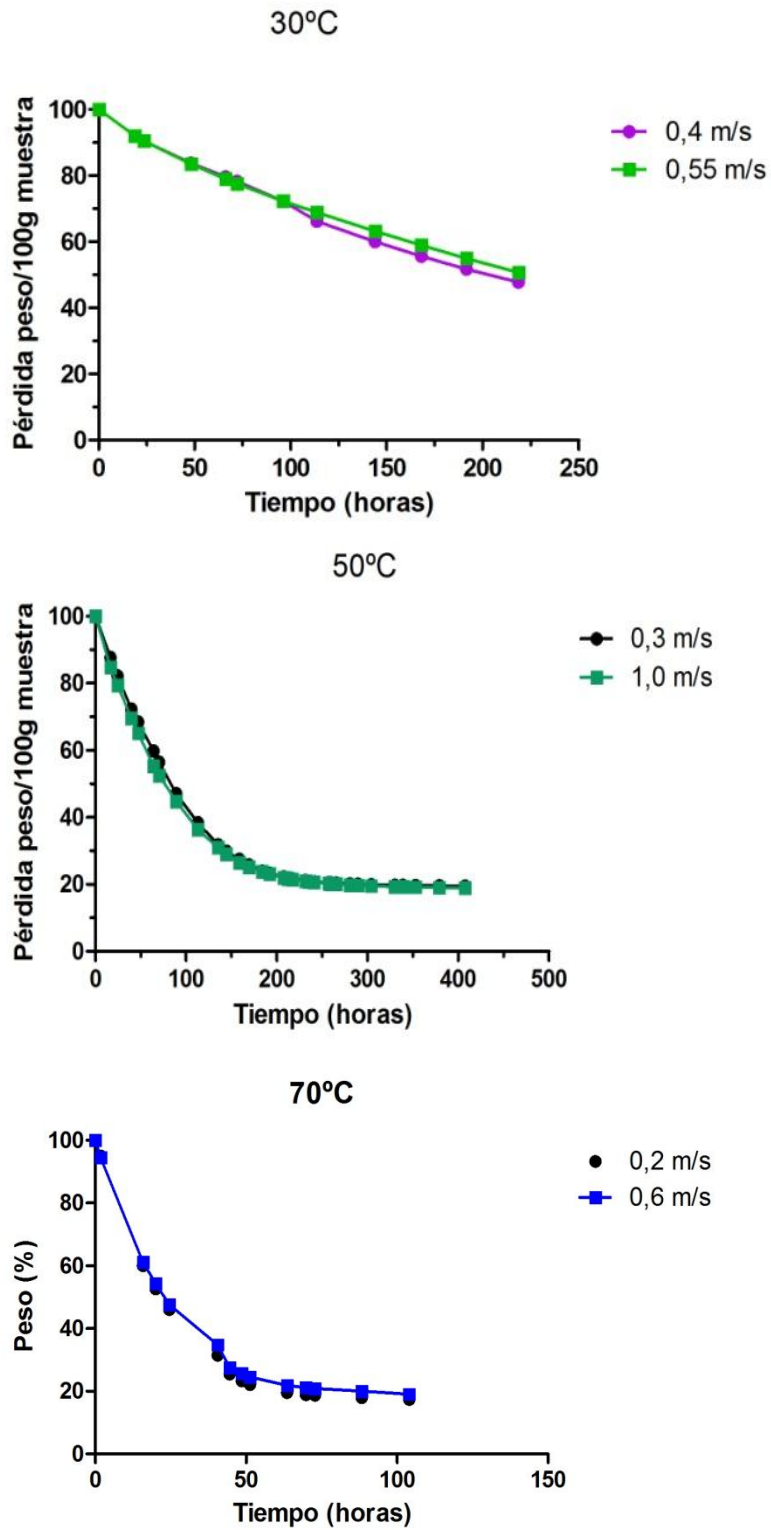
mediante un anemómetro (FV A915 S140, AHLBORN, Alemania) determinándose los siguientes rangos de medida:

- Estufa Selecta Hotcold-UL (30°C): de 0,4 a 0,5 m/s.
- Deshidratador Sedona Rawfood (50°C): de 0,3 a- 1,0 m/s.
- Estufa Selecta (70 y 90°C): de 0,2 a 0,6 m/s.

Se caracterizó la velocidad del aire de las estufas y realizaron curvas de deshidratación de ciruelas colocadas en los puntos donde se habían medido las mayores diferencias de velocidad del aire. La figura 4.6 muestra a modo de ejemplo las curvas de deshidratación obtenidas a 30, 50 y 70°C de ciruelas colocadas en posiciones que variaban desde los 0,3 hasta 1 m/s. Como se observa, las curvas fueron similares independientemente de la velocidad del aire. Resultados similares se obtuvieron para otras condiciones y equipos tanto en las muestras control como en las tratadas por PEAV. Según estos resultados, las posibles diferencias que se pudieran detectar no serían debidas a la velocidad del aire dentro del rango aplicado posiblemente debido a que las velocidades podían considerarse bajas. Como se ha indicado anteriormente, para reducir el 30% el tiempo de secado de arándanos era necesario aumentar alrededor de 100 veces la velocidad del aire, desde 0,4 m/s hasta 45 m/s (Yemmireddy *et al*, 2013).

#### **4.7 Rehidratación de las muestras**

Se realizó un estudio preliminar de la rehidratación de ciruelas deshidratadas a 90°C mediante la inmersión de las muestras tratadas y no tratadas por PEAV (4 kV/cm - 10 p) en agua a 25°C. Debido a que las ciruelas flotaban, fue necesario utilizar material del laboratorio para mantenerlas bajo el agua. A lo largo del tiempo de rehidratación, se determinaba el peso de las ciruelas una vez escurridas. Las gráficas de rehidratación se obtuvieron representando el peso de las muestras expresado en porcentaje a lo largo del tiempo de rehidratación.



**Figura 4.6.** Curvas de deshidratación de ciruelas obtenidas a 30, 50 y 70°C con distintas velocidades del aire de deshidratación.

#### 4.8 Descripción de las curvas de deshidratación con modelos matemáticos

Las curvas de deshidratación se describieron utilizando la ecuación 1 basada en el modelo de Fick:

$$Y = X_e + (X_i - X_e) \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $Y$  es la pérdida de peso a lo largo del tiempo (g);  $X_i$  es el peso inicial (en %);  $t$  es el tiempo de secado (h);  $X_e$  es el peso de la muestra detrás un tiempo infinito de deshidratación (en %); y  $k$  es una constante que representa la velocidad de deshidratación ( $\text{h}^{-1}$ ). En este estudio, debido a que en algunas condiciones de secado las muestras no se deshidrataron completamente, el valor  $X_e$  se calculó en aquellas curvas donde el proceso de deshidratación se completó. A partir de los valores obtenidos se calculó el valor medio y este valor medio (14% peso) se consideró constante para los ajustes de todas las curvas. Como los resultados se han presentado en tanto por ciento, el valor  $X_i$  en todos los casos era de 100%. La ecuación 1 se ajustó a los valores experimentales mediante técnicas de regresión no lineal con el programa de análisis estadístico Prism 5.0 (GraphPad Prism 5, San Diego, CA). La bondad del ajuste se determinó a partir del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la raíz del error cuadrático de la media (RECM) según las expresiones:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y)^2} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{RECM} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}}{n-1} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde  $y_i$  es el valor estimado con el modelo;  $\hat{y}$  es el valor medio observado;  $y_i$  es el valor observado; y  $n$  es el número total de observaciones. Mientras que el  $R^2$  informa sobre la proporción de la variabilidad total que explica el modelo elegido y el RECM puede considerarse como el promedio de la discrepancia entre los valores observados y los estimados por el modelo. Valores del RECM próximos a 0 indican un buen ajuste del modelo a los datos experimentales.

#### 4.9 Análisis de datos.

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5.0 (GraphPad Prism 5, San Diego, CA). Los datos presentados representan los valores medios de las medidas

realizadas al menos en tres muestras diferentes. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de la media. La existencia de diferencias estadísticamente significativas se determinó mediante el test t de Student ( $p=0,05$ ).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El objetivo general de este estudio fue evaluar si la aplicación de un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje a ciruelas antes de su deshidratación permitía reducir el tiempo o la temperatura de secado en comparación a un proceso tradicional de deshidratación con aire. Para ello, fue necesario elaborar las curvas de deshidratación a distintas temperaturas de ciruelas control y tratadas por PEAV a distintas intensidades y describirlas matemáticamente para cuantificar el efecto de la temperatura y los tratamientos PEAV en la velocidad de deshidratación. Antes de elaborar las curvas de deshidratación, fue necesario establecer las condiciones de tratamiento por PEAV que permitían obtener el mayor grado de electroporación de las células de las ciruelas con el menor consumo energético.

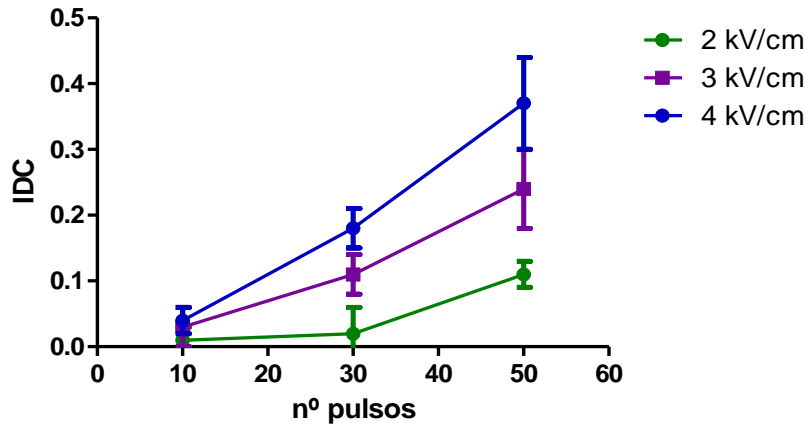
### **5.1 Determinación de las condiciones óptimas de electroporación de las ciruelas.**

Como ya se ha indicado en la introducción, se han sugerido distintos procedimientos para cuantificar el grado de electroporación provocado por la aplicación de tratamientos de PEAV con objeto de establecer de manera rápida y precisa las condiciones de tratamiento más adecuadas (Puértolas, 2012). Entre todos ellos, en este estudio se utilizó para cuantificar el grado de electroporación de las células de las ciruelas tratadas y no tratadas el IDC así como la comparación de la cantidad de líquido que se elimina de las ciruelas sometidas a tratamientos de distinta intensidad PEAV al aplicar una suave centrifugación. En el caso del IDC, cuando el tejido está totalmente intacto e íntegro, el parámetro  $Z_p$  tiene un valor de 0; por el contrario, cuando las células están totalmente permeabilizadas, el valor es de 1. Dependiendo del grado de permeabilización celular, el parámetro  $Z_p$  oscila entre valores de 0 y 1, expresándose en tanto por 1 el porcentaje de células permeabilizadas. En el caso de la cantidad de líquido extraído por centrifugación, este procedimiento está basado en que la permeabilización de las membranas celulares provocada por el tratamiento de PEAV favorece la salida del agua

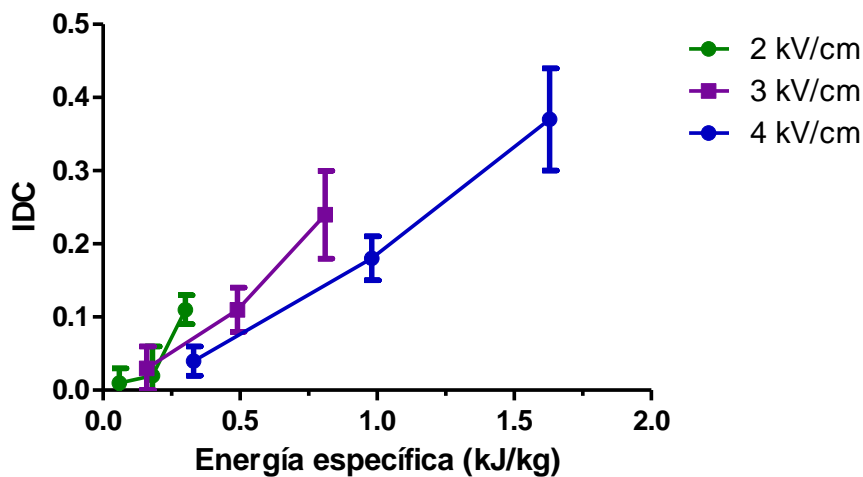
intracelular, de modo que cuanto mayor es el grado de permeabilización obtenido, mayor debería ser la cantidad de líquido liberado por centrifugación.

### **5.1.1. Evaluación de los PEAV en el índice de desintegración celular.**

La Figura 5.1 muestra los IDC obtenidos de las ciruelas tratadas a distintas intensidades del campo eléctrico (2, 3 y 4 kV/cm) y número de pulsos (10, 30 y 50 pulsos de 3  $\mu$ s). Como se observa, el IDC aumenta con el número de pulsos y con la intensidad del campo eléctrico, obteniéndose los mayores índices cuánto más intenso era el tratamiento. En este caso, el porcentaje de células permeabilizadas sería de un 37%. Por otro lado, para conseguir un determinado IDC, se requiere un menor número de pulsos cuanto más elevado es el campo eléctrico aplicado. Por ejemplo, para permeabilizar el 10% de las células, serían necesarios unos 17 pulsos de 4 kV/cm, 30 de 3 kV/cm y 50 a 2 kV/cm. Con el fin de determinar la permeabilización causada por los PEAV desde un punto de vista energético, la Figura 5.1 se representó en función de la energía específica aplicada (Figura 5.2). Como se observa, el IDC aumentó con la energía aplicada a todos los campos eléctricos. En esta representación, para una misma cantidad de energía aplicada, el número de células permeabilizadas fue mayor cuanto menor era el campo eléctrico. Por ejemplo, al aplicar 0,75 kJ/kg, el IDC para pulsos de 4 kV/cm era de alrededor de 0,13, mientras que a 3 kV/cm era de 0,22. Según estos resultados y los de la Figura 5.1, para un mismo nivel energético de PEAV, puede resultar más interesante aplicar más número de pulsos para conseguir mayores IDC. Sin embargo, estos resultados son inconcluyentes ya que Luengo et al. (2015) observaron que el IDC aumentaba con la energía específica hasta los 20 kJ/kg aplicados, independientemente de la intensidad del campo eléctrico y del número de pulsos, utilizando como matriz discos de remolacha roja. Es por ello que harían falta más datos para obtener conclusiones más claras o si por el contrario dependiendo de la matriz alimentaria, el comportamiento de los PEAV es diferente. Por ejemplo, Luengo et al. (2013, 2014) observaron en piel de naranja y de tomate que tratamientos superiores a 15 pulsos a distintos campos eléctricos (entre 3 y 7 kV/cm) apenas incrementaban el IDC.



**Figura 5.1.** Influencia de la intensidad del campo eléctrico y el número de pulsos en el IDC de la ciruela tratada por PEAV.



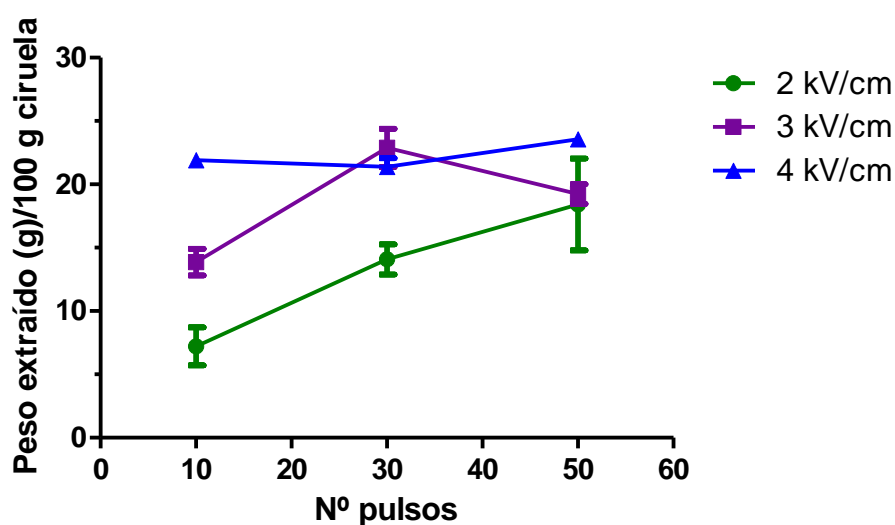
**Figura 5.2.** Influencia de la intensidad del campo eléctrico y la energía específica en el IDC de la ciruela tratada por PEAV.

### 5.1.2. Evaluación del efecto de los PEAV en el líquido intracelular extraído por centrifugación.

La Figura 5.3 compara el porcentaje de líquido extraído por centrifugación de las ciruelas sometidas a tratamientos de PEAV a tres intensidades de campo eléctrico (2, 3 y 4 kV/cm) y distintos números de pulsos (10, 30 y 50 pulsos de 3  $\mu$ s). Mientras que en las muestras sin tratar (0 pulsos) apenas se observó la salida de líquido tras la centrifugación (datos no mostrados), en las tratadas independientemente del tratamiento aplicado se observa que la aplicación de un tratamiento de PEAV previo a la centrifugación favoreció la salida del líquido intracelular. Por lo tanto, estos resultados confirman que los tratamientos habían provocado el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares. Se observa que la cantidad de líquido extraído era mayor al

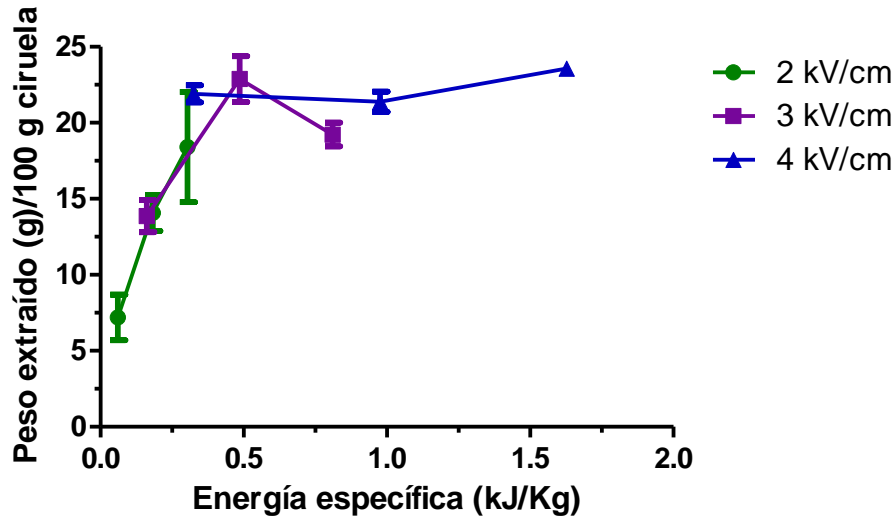


aumentar la intensidad del campo eléctrico aplicado sobre todo cuando sólo se aplicaron 10 pulsos. A campos eléctricos de 2 kV/cm, el volumen extraído incrementó con el número de pulsos; sin embargo, a 3 y 4 kV/cm tratamientos de más 30 pulsos o más no provocarían una mayor extracción de líquido, indicando que tratamientos de 3 kV/cm y 30 pulsos o de 4 kV/cm y 10 pulsos serían suficiente para conseguir el mayor grado de electroporación en el rango investigado.



**Figura 5.3.** Influencia de la intensidad del campo eléctrico y el número de pulsos en la cantidad de líquido extraído por centrifugación de ciruelas tratadas por PEAV.

Cuando la Figura 5.3 se representó en función de la energía específica aplicada a todos los campos eléctricos investigados (Figura 5.4), se observa que el volumen de líquido extraído aumentó con la energía independientemente del campo eléctrico hasta valores de 0,5 kJ/kg. Estos niveles energéticos correspondían a tratamientos de 4 kV/cm y 10 pulsos o de 3 kV/cm y 30 pulsos con los que se conseguían porcentajes de extracción del 22-23%. Por encima de los 0,5 kJ/kg, tratamientos PEAV de mayor intensidad no permitían aumentar el volumen extraído por lo que estos tratamientos serían los que mayor nivel de permeabilización se podrían alcanzar dentro de los rangos investigados.



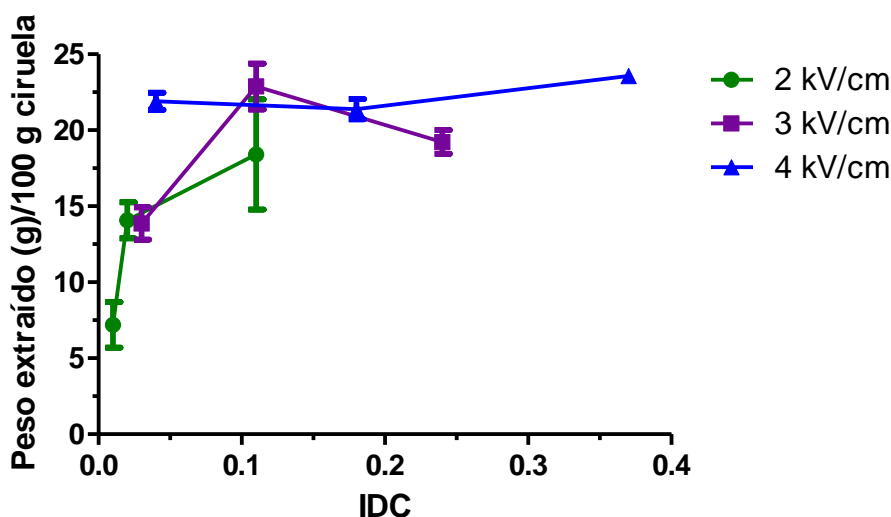
**Figura 5.4.** Influencia de la intensidad del campo eléctrico y la energía específica aplicada en la cantidad de líquido extraído por centrifugación de ciruelas tratadas por PEAV.

### 5.1.3. Relación entre el IDC y el líquido intracelular extraído por centrifugación.

Debido a que el IDC es una medida rápida y fácil de realizar y que se ha determinado que este parámetro aumenta con la intensidad de los tratamientos PEAV, podría resultar un índice adecuado para establecer las condiciones de tratamiento PEAV que permitan el mayor grado de desintegración celular y, por tanto, una mayor transferencia de masa requerida en los procesos de deshidratación. Sin embargo, al tratarse de una medida indirecta del mejor o peor paso de corriente de distintas frecuencias por un tejido podría haber diferente grado de permeabilización celular y producirse medidas inadecuadas si ese paso de corriente se ve facilitado por otros fenómenos como por ejemplo un mayor líquido extracelular sin que haya una permeabilización celular, aire ocluido, mayor o menor unión entre las células que forman el tejido, etc. Es por ello que la determinación del líquido intracelular extraído por centrifugación puede ser una técnica que se aproxime más a la mayor o menor modificación de la transferencia de masa por permeabilización celular y, por tanto, un indicativo más real del posible efecto de los PEAV para mejorar la deshidratación de las ciruelas. Con el fin de determinar si el IDC podría permitir predecir la mayor o menor extracción de líquido intracelular, se ha construido la Figura 5.5 que relaciona los IDC con la cantidad de líquido extraído para cada una de las condiciones PEAV investigadas. Como se observa, el porcentaje de líquido extraído aumenta hasta valores de IDC de alrededor de 0,1. Por encima de este valor, no se produce una mayor extracción de líquido. Es más, analizando con detalle

los resultados, se ha determinado una correlación lineal con un  $R^2$  de 0,84 entre el volumen extraído y el IDC hasta valores de éste de 0,05 (datos no mostrados). Es decir, en este rango es donde el IDC podría utilizarse para determinar de forma rápida y sencilla las condiciones de tratamientos PEAV que permitirían la mayor extracción de líquido y, por tanto, de permeabilización. Fuera de este rango, el IDC no sería un parámetro adecuado con tales fines.

En base a estos resultados obtenidos, un tratamiento de **4 kV/cm y 10 pulsos** (0,26 kJ/kg) sería uno de los tratamientos a elegir para evaluar el efecto de los PEAV en la mejora de los procesos de deshidratación a distintas temperaturas como se tratará a continuación.



**Figura 5.5** Relación entre el IDC y el volumen extraído por centrifugación conseguido al aplicar distintos tratamientos PEAV en ciruelas.

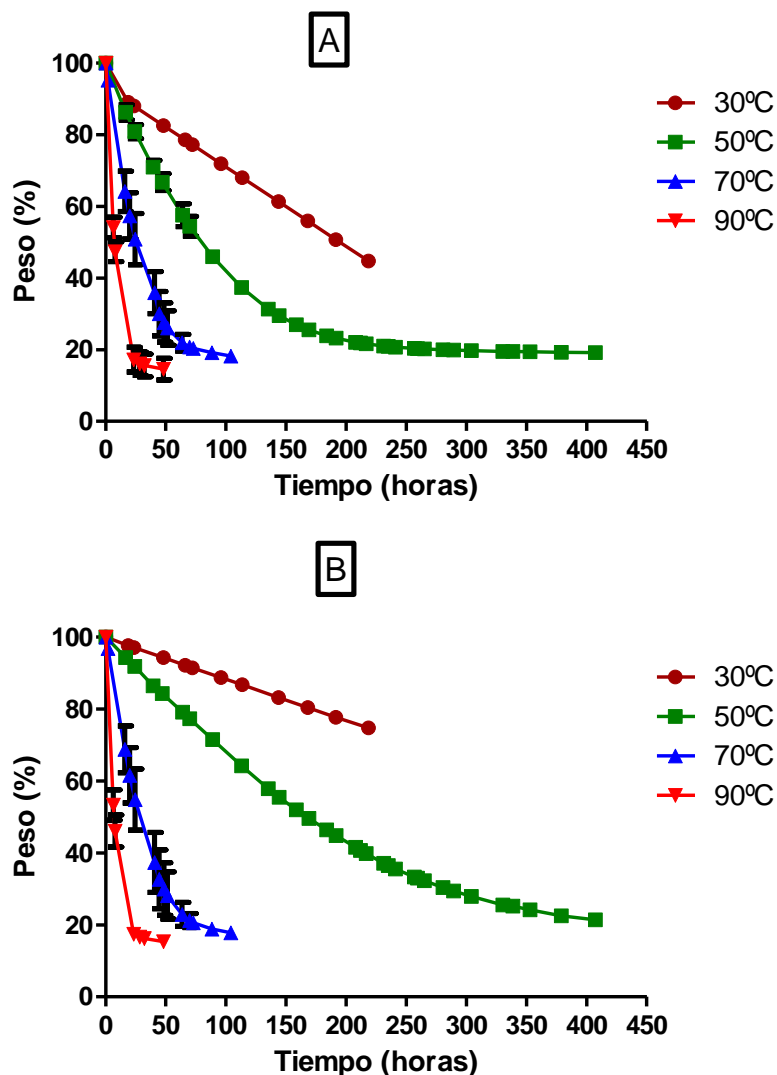
## 5.2. Influencia de la aplicación de tratamientos PEAV en las curvas de deshidratación de ciruelas obtenidas a distintas temperaturas.

Como se ha mostrado en las gráficas anteriores, el tratamiento de 4 kV/cm y 10 pulsos es el que más permeabiliza las células requiriendo para ello una menor energía (0,26 kJ/kg) en comparación con los otros tratamientos investigados por lo que es este el tratamiento utilizado para evaluar el efecto de los PEAV en la deshidratación de ciruelas a distintas temperaturas.

La Figura 5.6 muestra las curvas de deshidratación obtenidas durante el secado de las ciruelas tratadas por PEAV (Figura 5.6A) a 4 kV/cm y 10 pulsos y sin tratar (Figura 5.6B) a distintas temperaturas (30, 50, 70 y 90°C). Como se observa en ambas gráficas, se produce un descenso continuo del agua presente en las ciruelas a lo largo del tiempo

de deshidratación. Esta disminución del contenido en agua era más rápido conforme más elevada era la temperatura de deshidratación; es decir, la pérdida de peso estaba claramente influenciada por la temperatura. Un aspecto a señalar en todas las curvas de deshidratación a diferencia de la curva teórica de deshidratación descrita en la introducción, es que en ninguna de las curvas obtenidas se observó la fase inicial de precalentamiento. En todos los casos, independientemente de la temperatura y si las ciruelas estaban tratadas o no, las muestras comenzaron a perder peso desde el inicio del proceso. Este hecho puede ser debido a que la cantidad de ciruela que se introdujo en la estufa de deshidratación era muy pequeña comparado con el volumen de aire y rápidamente las ciruelas se acondicionaban a las condiciones de secado, comenzando a perder agua rápidamente una vez introducidas en la estufa de deshidratación.

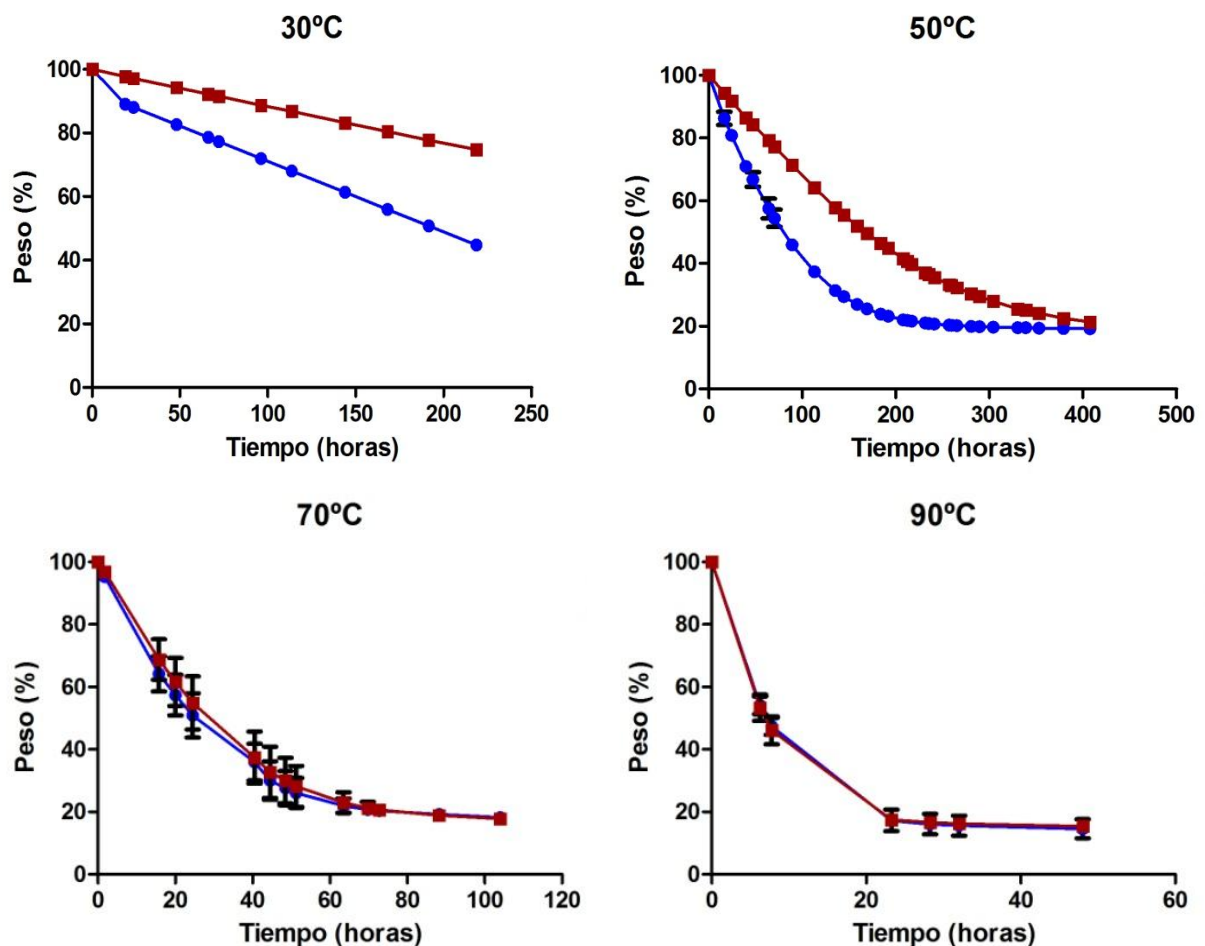
Con el fin de comparar más claramente el efecto de los tratamientos PEAV en las curvas de deshidratación, la Figura 5.7 muestra las curvas de deshidratación de ciruelas tratadas por PEAV y control a cada una de las temperaturas investigadas. Los símbolos se corresponden con los valores experimentales y las líneas con el ajuste de la ecuación 1 a estos valores. Como se puede observar, a 30 y 50°C, los tratamientos PEAV permitieron reducir significativamente el contenido en agua de las ciruelas para los mismos tiempos de deshidratación. O para conseguir el mismo nivel de deshidratación, el tiempo requerido fue menor cuando las ciruelas habían sido previamente tratadas por PEAV. Sin embargo, a temperaturas de 70 y 90°C, no se observaron diferencias significativas entre las curvas de deshidratación obtenidos a partir de las ciruelas tratadas y sin tratar. Es decir, 70°C sería una temperatura a partir de la cual el efecto del calor predomina sobre la permeabilización producida por los PEAV.



**Figura 5.6.** Curvas de deshidratación obtenidas a distintas temperaturas de ciruelas tratadas (A) o no por PEAV (B). Tratamiento PEAV: 4 kV/cm, 10 pulsos de 3 $\mu$ s, 0,26 kJ/kg

El ajuste de las curvas de deshidratación con la ecuación 1 basada en el modelo de Fick permitió describir con mayor precisión las curvas de deshidratación obtenidas y cuantificar el efecto de la temperatura y los PEAV en la velocidad de deshidratación. Como se indica en la sección de “Material y Métodos”, para realizar el ajuste se consideró el parámetro  $X_e$  como una constante cuyo valor fue de 14. Este valor se correspondía con el valor medio del peso de las muestras tratadas y no tratadas a 50, 70 y 90°C. Se eligieron estas condiciones porque las curvas de deshidratación se obtuvieron hasta que la muestra se deshidrató completamente. La Tabla 5.1 muestra los valores de la constante de velocidad  $k$  obtenidos al ajustar el modelo a las curvas de deshidratación obtenidas a las distintas condiciones experimentales. También se presenta el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la raíz del error cuadrático medio de los

ajustes (RECM). Los resultados mostrados en la Tabla 5.1 indican que el modelo describió adecuadamente los valores experimentales. En todos los casos, el coeficiente de determinación de los ajustes fue superior a 0,98. Por otro lado, se observa que el parámetro  $k$  estimado a partir del ajuste aumentó con la temperatura tanto en la deshidratación de las muestras control como de las muestras tratadas por PEAV. Un aumento del parámetro  $k$  implica una mayor cantidad de agua eliminada por unidad de tiempo y, por lo tanto, una mayor velocidad de deshidratación. Este parámetro fue superior en las muestras tratadas por PEAV a 30 y 50°C siendo entre 3 y 2 veces más rápida la deshidratación, respectivamente. A temperaturas de 70 y 90°C, no se observaron diferencias significativas en los valores  $k$  por lo que el pretratamiento de PEAV de las ciruelas no permitiría reducir los tiempos de deshidratación a estas temperaturas.



**Figura 5.7.** Curvas de deshidratación obtenidas a distintas temperaturas de ciruelas control (en rojo) y tratadas por PEAV (4 kV/cm, 10 pulsos de 3 $\mu$ s) (en azul). Los puntos son los datos experimentales y las líneas el ajuste obtenido con la ecuación 1.

Temperatura (°C)	PEAV				NO PEAV			
	K	SD	R <sup>2</sup>	RECM	K	SD	R <sup>2</sup>	RECM
30	0,0044 <sup>a</sup>	0,0001	0,997	0,518	0,0004 <sup>a*</sup>	0,0001	0,999	0,066
50	0,0109 <sup>b</sup>	0,0002	0,996	1,497	0,0054 <sup>b*</sup>	0,0001	0,997	1,314
70	0,0355 <sup>c</sup>	0,0006	0,997	1,267	0,0325 <sup>c</sup>	0,0007	0,997	1,578
90	0,1238 <sup>d</sup>	0,0019	0,999	0,628	0,1266 <sup>d</sup>	0,0019	0,999	0,632

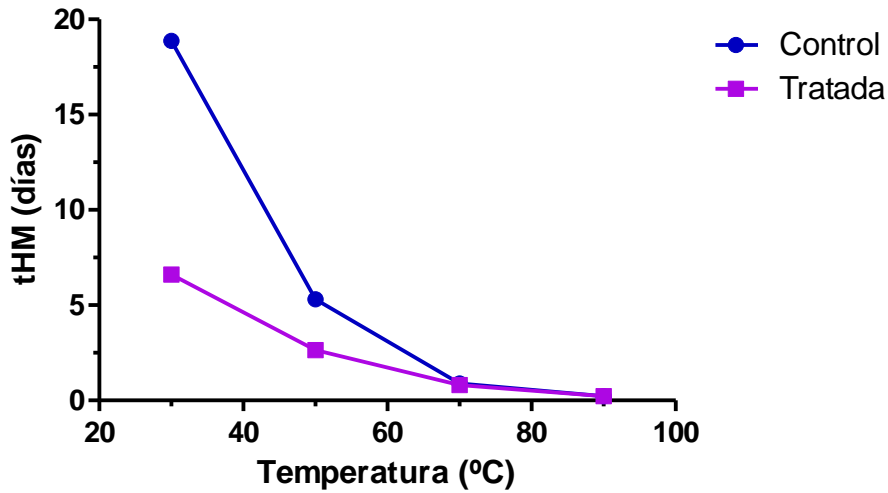
**Tabla 5.1.** Valores del parámetro  $k$  de la ecuación 1 e índices para valorar la bondad del ajuste de la ecuación 1 en las gráficas de deshidratación obtenidas en las distintas condiciones experimentales. Los valores con distintas letras indican diferencias significativas entre temperaturas. El \* indica diferencias significativas entre valores  $k$  de muestras PEAV y control.

A partir de los valores  $k$ , se puede calcular el tiempo de humedad media ( $t_{HM}$ ) que corresponde al tiempo en el que se reduce a la mitad el contenido de agua del alimento ( $X_i - X_e$ ) y se calcula según la siguiente expresión (Prism 5.0 - GraphPad Prism 5):

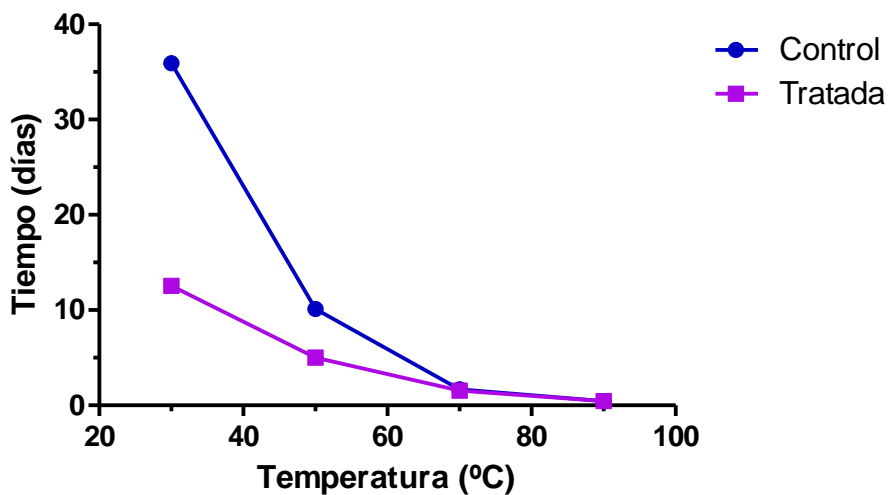
$$t_{HM} = 0,6932/k$$

La Figura 5.8 muestra los valores de  $t_{HM}$  para cada una de las condiciones investigadas. Esta figura presenta claramente que el tiempo para reducir el contenido de agua a la mitad disminuye con la temperatura de deshidratación y que los PEAV permitirían reducir dicho tiempo a 30 y 50°C un 65 y un 50%, respectivamente, valores en el rango o incluso superiores a los indicados en la literatura (Ade-Omowaye et al 2000, 2003; Knorr y Angersbach 1998). Como se ha comentado en la introducción, las ciruelas deshidratadas comerciales deben tener una humedad máxima del 23%, por lo que a partir de los datos de la Tabla 5.1 y la ecuación 1, se puede determinar el tiempo de deshidratación necesario para alcanzar dicha humedad a distintas temperaturas a partir de ciruelas tratadas o no por PEAV. De este modo, la Figura 5.9 muestra el tiempo necesario para deshidratar ciruelas hasta un contenido en humedad del 23%. De forma análoga a lo mostrado en la Figura 5.8, el tiempo de deshidratación se reduce con la temperatura desde casi los 36 días si se deshidratase el producto 30°C hasta 1,5 días o 10 horas a 70 y 90 °C, respectivamente, para ciruelas control. En el caso de las tratadas por PEAV, el tratamiento permitiría deshidratar el producto a 30°C en 12 días o en 5 a 50°C, es decir, reducir 3 y 2 veces el tiempo con respecto a las ciruelas control. Si bien los tiempos de deshidratación pueden resultar prolongados, las aplicación de PEAV en condiciones de deshidratación que podrían definirse como alejadas de las industriales sobre todo en lo que se debe a la velocidad del aire utilizado, permitiría deshidratar

ciruelas a temperaturas relativamente moderadas que podrían permitir mantener propiedades nutricionales de las ciruelas frescas en mayor medida que procesos a temperaturas más elevadas. Este sería un aspecto interesante a evaluar en futuras investigaciones.



**Figura 5.8.** Relación entre el tiempo en el que se reduce a la mitad el contenido de agua de las ciruelas ( $t_{HM}$ ) y la temperatura de deshidratación de ciruelas tratadas por PEAV y control.



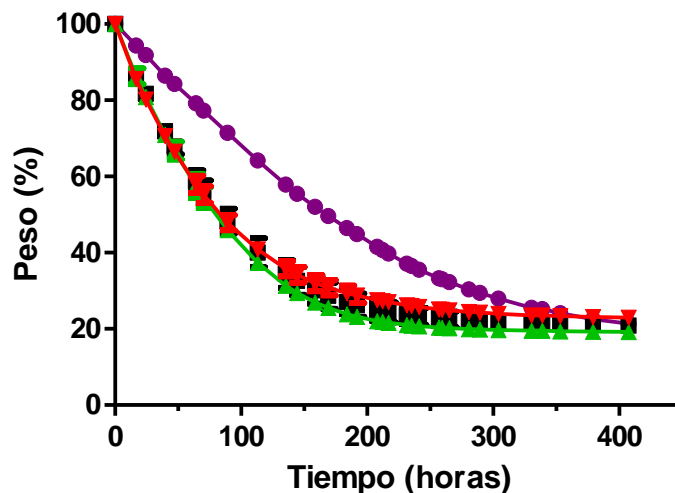
**Figura 5.9.** Tiempo de deshidratación necesario para reducir al 23% la humedad de las ciruelas a distintas temperaturas de deshidratación de ciruelas tratadas por PEAV y control.

### 5.3. Optimización de los tratamientos PEAV para la deshidratación de ciruelas a baja temperatura.

Con el fin de evaluar la posibilidad de reducir aún más los tiempos de deshidratación a aquellas temperaturas en las que mayores efectos se habían observado (30 y 50°C), se evaluó el efecto de distintos tratamientos PEAV en las posteriores curvas de



deshidratación. En una primera investigación, se determinó el efecto de tratamientos PEAV que habían permitido obtener mayores IDC y líquido extraído por centrifugación mostrados en los apartados anteriores (Figuras 5.2 y 5.4) para temperaturas de deshidratación a 50°C. Así, se analizaron los tratamientos de 3 kV/cm-30p (0,42 kJ/kg) y 4 kV/cm-50p (1,32 kJ/kg) además del ya investigado 4 kV/cm-10p (0,26 kJ/kg) y las muestras control no tratadas. La Figura 5.10 muestra la evolución del peso de las ciruelas a 50°C sometidas a estos tratamientos. Como se observa, la deshidratación fue más rápida en las ciruelas tratadas por PEAV que las no tratadas no observándose diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en las pérdidas de agua de las ciruelas tratadas por los diferentes tratamientos PEAV. Cualquiera de los tratamientos PEAV aplicados duplicó la velocidad de deshidratación en comparación con las muestras no tratadas (valor  $k$  para el control  $0,004\pm 0,0003$ ;  $0,0116\pm 0,0004$  para 3 kV/cm, 30 p;  $0,0119\pm 0,0006$  para 4 kV/cm, 10 p;  $0,0124\pm 0,0002$  para 4 kV/cm, 50 p), permitiendo reducir a la mitad el tiempo de deshidratación. Sin embargo, tratamientos de mayor IDC o líquido extraído (Figuras 5.2 y 5.4) no permitieron reducir aún más dicho tiempo. Es decir, el tratamiento de 4 kV/cm y 10 pulsos de 3  $\mu$ s resultó el más adecuado de los 3 investigados ya que permitió alcanzar la misma reducción de tiempo de deshidratación con un menor coste energético de los tratamientos PEAV (0,26 kJ/kg).

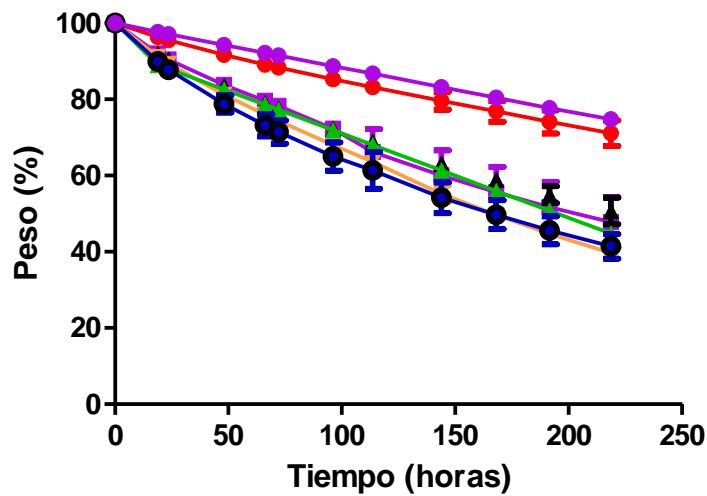


**Figura 5.10.** Curvas de deshidratación a 50°C obtenidas a partir de ciruelas control (●) y tratadas por distintos tratamientos PEAV: 3 kV/cm, 30 p, 0,42 kJ/kg (■); 4 kV/cm, 10 p, 0,26 kJ/Kg (▲); 4 kV/cm, 50 p, 1,32 kJ/kg (▼).

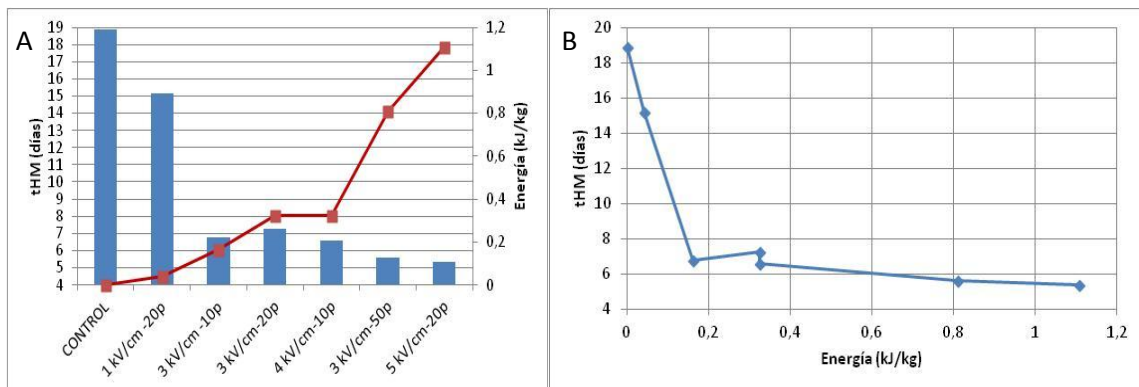
Con el fin de optimizar el efecto de los tratamientos PEAV, se hizo una última investigación a 30°C que fue donde mayores reducciones en el tiempo de deshidratación se habían observado al aplicar tratamientos PEAV. En este caso, se investigó un rango más amplio de intensidades PEAV por encima y por debajo de los rangos estudiados anteriormente con el fin de determinar el mínimo tratamiento PEAV que permita obtener reducciones de tiempo de deshidratación así como tratamientos más elevados que maximicen dicha reducción y que, desde un punto de vista práctico, pudieran ser aplicados industrialmente. Así, se evaluaron tratamientos desde 1 a 5 kV/cm aplicando entre 10 y 50 pulsos de 3  $\mu$ s lo que suponía un rango de energías de 0,03 a 1,32 kJ/kg.

La Figura 5.11 muestra las curvas de deshidratación a 30°C obtenidas para ciruelas control y tratadas por PEAV de distintas intensidades. Como se observa, todos los tratamientos PEAV permitieron aumentar la velocidad de deshidratación con respecto al control si bien el tratamiento de 1 kV/cm-20p que apenas redujo en 1,2 veces la velocidad de deshidratación. El resto de tratamientos PEAV permitió reducir entre 2,6 y 3,5 veces la velocidad de deshidratación con respecto al control. Los tratamientos de 5 kV/cm, 10 pulsos y el de 3 kV/cm, 50 pulsos son los que permitieron las mayores velocidades de deshidratación, si bien los consumos energéticos de estos tratamientos fueron mayores. Con el fin de comparar más claramente los resultados, se han construido las Figuras 5.12A y B donde se muestra el  $t_{HM}$  para cada uno de los tratamientos aplicados así como su coste energético (Figura 5.12A) y la relación entre el  $t_{HM}$  con la energía aplicada en cada tratamiento (Figura 5.12B). Como se observa en la Figura 5.12A, los tratamientos de 3 kV/cm, 10 p, 3 kV/cm, 20 p y 4 kV/cm, 10 p permitieron obtener un  $t_{HM}$  similar (alrededor de 7 días) con unos niveles energéticos parecidos; en cambio los tratamientos de 3 kV/cm, 50 p y 5 kV/cm, 20 p redujeron aún más los  $t_{HM}$  a 5,3 y 5,6 días, respectivamente, pero con unos consumos energéticos entre 5 y 7 veces superiores que los anteriores. Independientemente de la reducción en el tiempo de deshidratación, desde un punto de vista energético, la aplicación de tratamientos PEAV de hasta 0,2 kJ/kg resultaría muy rentable para reducir el tiempo de deshidratación a 30°C, mientras que por encima de este valor, reducir el  $t_{HM}$  resultaría mucho menos eficiente. En base a todos estos resultados, podría proponerse el tratamiento de **3 kV/cm, 10 p y 0,16 kJ/kg** como el tratamiento más adecuado para reducir el tiempo de deshidratación de ciruelas a 30°C acortándolo en un 64%

comparado con el control. Habría que evaluar si este tratamiento también sería de elección a otras temperaturas y con otras velocidades de deshidratación.



**Figura 5.11.** Curvas de deshidratación a 30°C obtenidas a partir de ciruelas control (●) y tratadas por distintos tratamientos PEAV: 1 kV/cm, 20p, 0,03 kJ/kg (●), 3 kV/cm, 10 p, 0,14 kJ/kg (■); 3 kV/cm, 20 p, 0,30 kJ/kg (▲); 3 kV/cm, 50 p, 0,70 kJ/kg (▼); 4 kV/cm, 10 p, 0,26 kJ/Kg (▲); 5 kV/cm, 20 p, 0,83 kJ/kg (●).

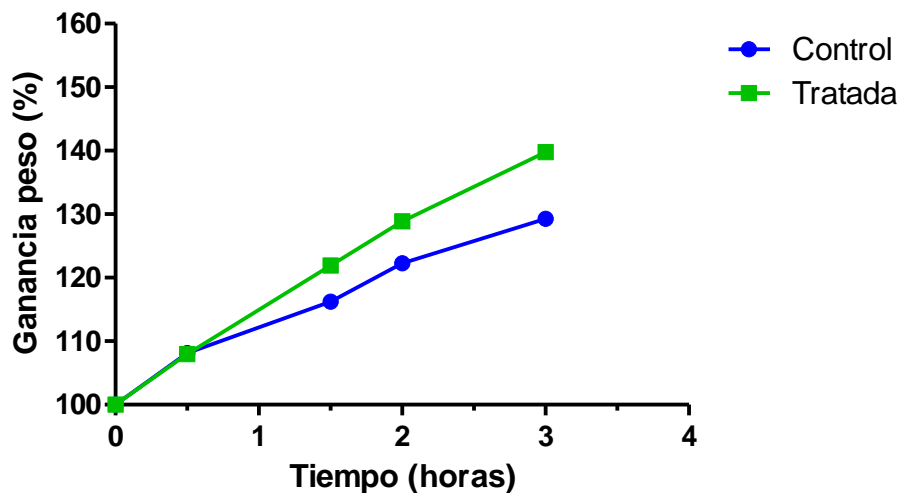


**Figura 5.12.** Relación entre el  $t_{HM}$  y la energía aplicada para cada uno de los tratamientos PEAV aplicados (Figuras A y B)

#### 5.4 Rehidratación de las ciruelas

Si bien el objetivo de este trabajo fue el de evaluar las ventajas de aplicar tratamientos PEAV para acortar el tiempo de deshidratación, se hicieron unas pruebas preliminares cuyos resultados nos han resultado de interés y se han incluido en esta memoria. Así la Figura 5.13 muestra la ganancia de peso de ciruelas deshidratadas a 90°C previamente tratadas o no por PEAV al sumergirlas en agua a temperatura ambiente. Como se

observa, las muestras PEAV siempre mostraron una mayor rehidratación a cualquier tiempo de rehidratación. Por ejemplo a las 3 horas, las ciruelas PEAV se habían rehidratado un 10% más que la ciruela control, siendo esta diferencia de un 80% tras 15 horas (datos no mostrados). Estos resultados indican que si bien el tratamiento PEAV no permitió observar diferencias significativas en las curvas de deshidratación a partir de 70°C, la permeabilización producida por los PEAV sí que resultó eficaz en el proceso de deshidratación. Estos resultados abren la posibilidad de realizar nuevas investigaciones en este sentido con un potencial práctico importante ya que el procesado de las ciruelas conlleva una fase de rehidratación de las mismas cuando van a ser comercializadas como se ha indicado en la introducción.



**Figura 5.13.** Curvas de rehidratación de ciruelas control y tratadas por PEAV (4 kV/cm, 10 p) en agua a 25°C.

Finalmente, destacar un efecto que se observó en las ciruelas tras someterlas a tratamientos PEAV y es que éstas se pelaban mucho más fácilmente que las ciruelas control. Este es un efecto descrito en el caso de los tomates y que se plantea como posible alternativa al pelado con vapor de agua por tratarse de un proceso energéticamente menos costoso, pero que nunca antes se había descrito en las ciruelas. Este efecto poco descrito y sobre el que no se han planteado hipótesis para explicarlo, abre nuevas posibilidades de la tecnología de los PEAV para el pelado de productos a nivel industrial reduciendo costes de procesado. A modo ilustrativo se incluye el siguiente enlace (<https://www.youtube.com/watch?v=DRciABpkFi4>) y código QR en el que se muestra un vídeo del pelado manual de una ciruela control y otra tratada por PEAV (4 kV/cm, 30 pulsos).

Código QR del vídeo de las ciruelas



## **6. CONCLUSIONES**

En este trabajo, se ha investigado el efecto de distintos pretratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje de ciruelas previa a su deshidratación por aire, a distintas temperaturas. Se ha observado que la aplicación por PEAV permite permeabilizar las células de la ciruela en mayor medida cuanto mayor es la intensidad del tratamiento aplicado cuando este parámetro se mide en base al IDC. Sin embargo, en base a la determinación de la cantidad de líquido intracelular extraído por centrifugación, se determinó un tratamiento máximo (4 kV/cm y 10 pulsos de 3  $\mu$ s, 0,26 kJ/kg) por encima del cual no incrementaba el porcentaje de líquido extraído. Ese tratamiento fue el que mayor nivel de permeabilización producía con un menor consumo energético del proceso PEAV. La aplicación de este tratamiento permitió reducir entre 2 y 3 veces la velocidad de deshidratación cuando esta se realizó a 50 y 30°C, respectivamente. A temperaturas de 70 y 90°C, el pretratamiento de PEAV de las ciruelas no permitió reducir los tiempos de deshidratación, aunque sí que aumentar la velocidad de rehidratación de ciruelas deshidratadas a 90°C.

Finalmente, la optimización de los tratamientos a temperaturas en las que se observó efecto de los PEAV en la deshidratación, (30 y 50°C), permitió determinar que un tratamiento de 3 kV/cm y 10 p que supone un consumo energético de tan solo 0,16 kJ/kg sería el tratamiento de elección en procesos de deshidratación a baja temperatura. Concretamente, a 30°C permitió reducir el tiempo de deshidratación de las ciruelas un 64% comparado con las muestras control no pretratadas por PEAV.

## **CONCLUSIONS**

In this study, the matter of investigation has been the effect of different Pulsed Electric Fields pre-treatment in plums before it started to be dehydrated whit air using different temperatures. It has been observed that the pulsed electric field application allows for electroporation plum's cells, being bigger when the treatment increases, measured with IDC values. However, according to the use of the quantity of liquid extracted

centrifuging the samples, it has been determined a maximum treatment (4 kV/cm and 10 pulses of 3 $\mu$ s, 0, 26 kJ/kg). The fact is that beyond of that treatment the percentage did not increase. That treatment has proved to be the one to produce the highest degree of electroporation, using less energy to manage it. The application of this treatment allowed to reduce the speed of plum's dehydration between 2 and 3 times using 30 and 50°C respectively. Using 70 and 90°C, PEF's pretreatment of plums didn't reduce the dehydration time despite of increasing speed dehydration at 90°C.

Finally, optimization treatment at certain temperatures, 30 and 50°C, being the ones where the effect of PEF in dehydration was observed, allowed to determine that 3 kV/cm-10 pulses that require 0, 16 kJ/kg, was the chosen treatment in dehydration process at low temperatures. Specifically, at 30°C it enabled to reduce dehydration's time in 64%, in comparison to non treated with PEF control's samples.

## **7. APORTACIONES Y VALORACION DE LA ASIGNATURA**

Las aportaciones que me ha supuesto realizar en este trabajo en materia de aprendizaje son varias, en primera lugar he aprendido a tener soltura en el laboratorio ya que el trabajo lo realizaba yo sola, aunque con ayuda de profesores y becarios cuando lo necesitaba. El trabajo ha sido más autónomo e individual, cosa que he agradecido porque he aprendido a valerme más por mí sola (en la carrera todos los trabajos de laboratorio y prácticas son grupales). También he podido profundizar en la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, conocer aplicaciones y trabajos realizados con ellos.

En definitiva, este trabajo así como el "Trabajo de Fin de Grado" opino que nos ayuda muchísimo a los estudiantes, a evaluar y razonar lo aprendido a lo largo de la carrera y poder aplicarlo, en parte, a tu trabajo de investigación. Trabajas más con los profesores y profesionales en la universidad lo que siempre aporta calidad a tu investigación ya que aprendes mucho de ellos: realizar análisis, obtener y analizar los datos, redactar informes, etc.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abenoza, M., Benito, et al., 2012.** Effects of Pulsed Electric Field on Yield Extraction and Quality of Olive Oil. *Food and Bioprocess Technology*. 6 (6), 1367-1373.
- Ade-Omowaye BIO, et al., 2000.** Impact of high intensity electric field pulses on cell permeabilisation and as pre-processing step in coconut processing. *Innovative Food Science and Technologies* 1, 203-209.
- Ade-Omowaye BIO, et al., 2001.** Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science and Technology* 12, 285-295.
- Ade-Omowaye BIO, et al., 2003.** Combined effects of pulsed electric field pre-treatment and partial osmotic dehydration on air drying behaviour of red bell pepper. *Journal of Food Engineering* 60, 89-98.
- Barbosa-Cánovas, G.V, et al., 2001.** Pulsed electric fields: A novel technology for food preservation. *Agro Food Industry Hi- Technology* 12: 9-14.
- Casp, A., y Abril, J., 2003.** Procesos de conservación de alimentos. Editorial Mundi-Prensa, Madrid. ISBN 84-8476-169-X
- Comisión Europea, Reglamento (CE) nº464/1999** de la Comisión de 3 de marzo de 1999 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 2201/96 del Consejo en lo que respecta al régimen de ayuda a las ciruelas pasas. Diario Oficial de la Unión Europea L 56/10, de 4 de marzo de 1999.
- Donsi F, et al., 2010.** Application of pulsed electric fields treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. *Food Engineering Reviews*, 2, pp. 109-130.
- Feng, H., 2002.** Analysis of microwave assisted fluidized-bed drying of particulate product with a simplified heat and mass transfer model. *International Communications in Heat and Mass Transfer* 29, 1021–1028.
- Giuseppe Muratore et al., 2008.** Partial dehydration of cherry tomato at different temperature, and nutritional quality of the products. *Food Chemistry*. 111 (2008) 887-891
- Knorr D, and Angersbach A, 1998.** Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science and Technology* 9, 185-191.
- López N, et al., 2008.** Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 477-482.
- López N, 2008.** Mejora de la transferencia de masa mediante Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje: aplicación a la extracción de sacarosa, betaninas y al proceso de elaboración de vino. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.*

- López N, et al., 2009.** Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1225-1231.
- Luengo, E, et al., 2013.** Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17: 79-84
- Luengo, E, et al., 2014.** Improving carotenoid extraction from tomato waste by pulsed electric field. *Frontiers in nutrition*. ISSN: 2296-861X. Editorial Office.
- Luengo E, et al., 2015.** Evolución de la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje para la mejora de distintos procesos de extracción. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.*
- Newman G.M., et al., 1996.** Factors influencing the drying of prunes 1. Effects of temperature upon the kinetics of moisture loss during drying. *Food chemistry*, 57(2):241-244.
- Puértolas E, et al., 2010.** Effects of pulsed electric fields processing of red grapes on wine chromatic and phenolic characteristics during aging in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, aceptado. Doi: 10.1021/jf904035v.
- Sharma, et al., 2003.** Ingeniería de alimentos: operaciones unitarias y prácticas de laboratorio. Editorial Limusa. ISBN 9681862031
- Toepfl, S., et al., 2006.** Applications of pulsed electric field technology for the food industry In *Pulsed Electric Field Treatment of Foods*, Ed: Raso, J. und Heinz, V., p. 197-221, Elsevier, Oxford, UK.
- Urfalino, D.P. 2013.** Proceso para la obtención de ciruelas pasas. *Estación Experimental Agropecuaria Rama Caída. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.* Artículo en línea. Consulta: 07/06/2015.
- Vorobiev E, and Lebovka NI, 2006.** Extraction of Intracellular Components by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 153-193). Springer: Nueva York.
- Yemmireddy, V.K, et al., 2013.** Effect of drying method on drying time and physico-chemical properties of dried rabbiteya blueberries. *Food Science and Technology* 50, 739-745.
- Zimmermann, U, et al.,1974.** Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*, 14: 881-899.
- Zimmermann, U., 1986.** Electric breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Review Physical Biochemistry Pharmacology*, 105: 196-256.