

**EVALUACIÓN DE DOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS PARA LA INACTIVACIÓN
DE LA ENZIMA PEROXIDASA EN BRÓCOLI (*Brassicaoleracea* L), VARIEDAD
LEGACY.**

**DIEGO NOLBERTO GUERRERO ARTEAGA.
DIEGO MARTIN TREJO ESCOBAR.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2012**

**EVALUACIÓN DE DOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS PARA LA INACTIVACIÓN
DE LA ENZIMA PEROXIDASA EN BRÓCOLI (*Brassicaoleracea* L), VARIEDAD
LEGACY.**

**DIEGO NOLBERTO GUERRERO ARTEAGA.
DIEGO MARTIN TREJO ESCOBAR.**

**Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial**

**Asesor:
DIEGO FERNANDO MEJIA ESPAÑA
Ingeniero Agroindustrial**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2012**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º de acuerdo 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

NOTA DE ACEPTACIÓN

MSc. OSCAR ARANGO

Dr. OSWALDO OSORIO

San Juan de Pasto, Febrero 10de 2012

DEDICATORIA

Hoy hecho realidad mi sueño quiero dedicar este triunfo a mi abuela María Elina, mi padre Alirio Venancio, mis tíos Liprando, María Eugenia y Orlado Javier, mis hermanos Wilmer y Jhipson, gracias por creer en mí e impulsarme en los momentos más difíciles, fue lo que me hizo ir hasta el final. Hoy por su ejemplos digno de superación y entrega, puedo ver alcanzado este logro, gracias por lo que han hecho de mí.

A una persona quien con su amor, cariño, paciencia y apoyo camino a mi lado hacia este triunfo, mi novia Maira Patricia, gracias amor.

A mi amigo y compañero de tesis Diego Martín Trejo E., gracias a su apoyo, comprensión y dedicación hoy lo vemos reflejado hecho una realidad esta investigación.

A Pedro Alexander Hernández (QEPD), con quien un día prometimos que terminaríamos nuestros estudios profesionales. Hoy doy por cumplida la promesa, amigo.

A mis amigos y demás personas, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo del éxito, mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles. A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

DIEGO GUERRERO A.

*"La adversidad vuelve sabio al hombre.
Lucio Anneo Séneca"*

A poco tiempo de terminar una etapa de mi vida, que forma parte de mis sueños y futuro quiero dedicar mi trabajo de grado:

A mis padres Ángel y Elena las personas más importantes de mi vida ya que con su apoyo, consejos, confianza y amor me permitieron crecer como persona y como profesional.

A mi hermano Juan Gabriel por estar siempre presente con su apoyo.

A mi tía María Inés por su apoyo y consejos los cuales me motivaron a conseguir esta meta y a crecer como persona.

A mi amigo y compañero Diego Guerrero con quien compartimos grandes momentos de amistad y estudio.

A mi amiga Maira Patricia por brindarme sus consejos y su apoyo incondicional.

A mis tías, tíos y primos por su apoyo.

A mis amigos, profesores, compañeros y todas aquellas personas que están siempre conmigo, es el momento de decirles gracias, por todos esos momentos y experiencias compartidas a lo largo de mi vida que me permitieron formarme como profesional y persona.

A todos mil gracias.

Diego Martin Trejo Escobar

"Hay que manifestar los sueños para que puedan comenzar a realizarse."

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Universidad de Nariño.

Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales - VIPRI

Grupo de investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria - TEA

Ing. Diego Fernando Mejía España.

PH.D Oswaldo Osorio.

PH.D Andrés Hurtado.

MSc. Oscar Arango.

Ing. David Álvarez.

Ing. Ana Lucia Pantoja.

Ing. Laura Inés Latorre.

Funcionarios Planta Piloto.

A las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
4. MARCO TEORICO	23
4.1. BROCOLI	23
4.2. ENZIMAS.....	25
4.2.1. Peroxidasa (POD)	27
4.3. CLOROFILA.	28
4.4. TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE INACTIVACIÓN ENZIMATICA.....	30
4.5. METODOLOGIAS PARA INACTIVACIÓN Y DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA.....	31
4.5.1. Obtención del extracto enzimático.....	31
4.5.2. Medición de la actividad enzimática de la peroxidasa.	31
4.6. METODOLOGÍAS PARA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS	32
4.7. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE LA PROTEÍNA PEROXIDASA.	33
5. DISEÑO METODOLÓGICO	34
5.1. PROCEDENCIA DE LA MUESTRA DE BRÓCOLI	34
5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
5.2.1. Análisis estadístico	37
5.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS.	37
5.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	39
5.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	40
5.6. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTETICOS (CLOROFILA).....	43
5.7. CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CLOROFILA	44
5.8. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE LA PROTEINA PEROXIDASA.	44
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	48
6.1. TRATAMIENTO POR AIRE CALIENTE.	48

6.1.1. Determinación de la actividad de la enzima residual de POD	48
6.1.2. Cuantificación de clorofilas	53
6.1.3. Cuantificación de proteína	60
6.1.4. Seguimiento en almacenamiento al ambiente	65
6.2. TRATAMIENTO POR INMERSION EN AGUA	74
6.2.1. Determinación de la actividad de la enzima residual de POD	74
6.2.2. Cuantificación de clorofilas	79
6.2.3. Cuantificación de proteína	85
6.2.4. Seguimiento en almacenamiento al ambiente	89
7. CONCLUSIONES	97
8. RECOMENDACIONES	98
BIBLIOGRAFIA	99

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1.	Análisis nutritivo y calórico, realizado en base a una porción de 100g de brócoli. 24
Cuadro 2.	Factores experimentales para tratamiento con aire caliente 35
Cuadro 3.	Factores experimentales para tratamiento por inmersión en agua 35
Cuadro 4.	Variable de respuesta para tratamiento con aire caliente e inmersión en agua..... 35
Cuadro 5.	Matriz del diseño para escaldado por inmersión en agua. 36
Cuadro 6.	Matriz del diseño para escaldado con aire caliente..... 36
Cuadro 7.	Protocolo de cuantificación. 41
Cuadro 8.	Diluciones de BSA de 0 – 2000 µg/mL. 45
Cuadro 9.	Resultados del diseño experimental 48
Cuadro 10.	Análisis de varianza para % AER 50
Cuadro 11.	Factores establecidos y óptimos 53
Cuadro 12.	Análisis de Varianza para Clorofila a 54
Cuadro 13.	Análisis de Varianza para Clorofila b 58
Cuadro 14.	Análisis de Varianza para Proteína. 62
Cuadro 15.	Seguimiento en almacenamiento. 65
Cuadro 16.	Parámetros mínimos permisibles para comercialización de brócoli. 65
Cuadro 17.	Análisis de la varianza para % AER..... 66
Cuadro 18.	Test: Tukey para % AER..... 67
Cuadro 19.	Análisis de la Varianza para clorofila a 68
Cuadro 20.	Test de Tukey para clorofila a 68
Cuadro 21.	Análisis de varianza para clorofila b..... 69
Cuadro 22.	Test de Tukey para clorofila b 69
Cuadro 23.	Análisis de varianza para cantidad de proteína (POD) 70
Cuadro 24.	Test de Tukey para cantidad de proteína (POD) 71
Cuadro 25.	Actividad residual para inmersión en agua 74
Cuadro 26.	Análisis de Varianza para % Actividad de la enzima residual 75
Cuadro 27.	Factores establecidos y óptimos..... 78
Cuadro 28.	Análisis de Varianza para Clorofila a 79
Cuadro 29.	Análisis de Varianza para Clorofila b 83
Cuadro 30.	Análisis de Varianza para Proteína 87
Cuadro 31.	Seguimiento en almacenamiento. 90
Cuadro 32.	Análisis de la varianza para % AER..... 91
Cuadro 33.	Test de Tukey para % AER..... 92
Cuadro 34.	Análisis de la Varianza para clorofila a 93
Cuadro 35.	Test de Tukey para clorofila a 93
Cuadro 36.	Análisis de varianza para clorofila b..... 94
Cuadro 37.	Test de Tukey para clorofila b..... 94
Cuadro 38.	Análisis de varianza para degradación de proteína 95
Cuadro 39.	Test de Tukey para de na. 96

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1.	Floretes de brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L), variedad Legacy.....	23
Figura 2.	Estructura de la enzima Peroxidasa.....	27
Figura 3.	Estructura de clorofilas a y b.....	29
Figura 4.	Secador de bandejas FIQ-LTDA - CST-800.....	37
Figura 5.	Congelador LG GC-P207BSRV.	38
Figura 6.	Baño termostataado EYELA N1001S-WD 115V	38
Figura 7.	Choque térmico.....	39
Figura 8.	Procesador de alimentos KALLEY K-HB150.....	39
Figura 9.	Centrifuga.....	40
Figura 10.	Extracto enzimático	40
Figura 11.	Espectrofotómetro GENESYS 10 UV-VIS.....	41
Figura 12.	Reacción de POD	42
Figura 13.	Extracto de pigmentos fotosintéticos.....	44
Figura 14.	Medición de POD por método de Bradford	45
Figura 15.	Brócoli fresco sin tratamiento	72
Figura 16.	Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 0.....	72
Figura 17.	Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 2.....	72
Figura 18.	Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 5.....	73
Figura 19.	Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 8.....	73
Figura 20.	Brócoli sin tratamiento día 8.....	73

LISTA DE GRAFICAS

Pág.

Grafica 1.	Actividad enzimática en el tiempo	42
Grafica 2.	Tendencia lineal de actividad enzimática	43
Grafica 3.	Curva patrón de BSA de 0 – 2000 µg/mL.	46
Grafica 4.	Curva patrón de BSA de 800 – 2000 µg/mL.	47
Grafica 5.	Cinética enzimática de POD a 48 y 55°C por 1 hora	49
Grafica 6.	Cinética enzimática de POD a 48 y 55°C por 3 horas.....	49
Grafica 7.	Log %AER a 48 y 55°C por 1 y 3 horas	50
Grafica 8.	Efectos principales para % AER.	52
Grafica 9.	Interacción para % AER.....	52
Grafica 10.	Superficie de respuesta para actividad residual de POD	53
Grafica 11.	Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila a.....	54
Grafica 12.	Efectos Principales para clorofila a.	56
Grafica 13.	Interacción para Clorofila a.	56
Grafica 14.	Superficie de respuesta para Clorofila a	57
Grafica 15.	Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila b.....	57
Grafica 16.	Efectos Principales para clorofila b	59
Grafica 17.	Interacción para Clorofila b.	60
Grafica 18.	Superficie de respuesta para Clorofila b	60
Grafica 19.	Concentración de proteína después del tratamiento según diseño estadístico para aire caliente	61
Grafica 20.	Curva de calibración de estándar de BSA de 800 – 2000 µg/ml y Concentración de proteína después del tratamiento con aire caliente.....	61
Grafica 21.	Efectos Principales para contenido de proteína.	63
Grafica 22.	Interacción para proteína.	64
Grafica 23.	Superficie de respuesta para proteína.	64
Grafica 24.	Días vs % AER.....	66
Grafica 25.	Días vs mg/g de Clorofila a.	66
Grafica 26.	Días vs mg/g de Clorofila b	66
Grafica 27.	Días vs ug/ml de proteína.	66
Grafica 28.	Grafica de medias para reactivación de POD	67
Grafica 29.	Grafica de medias para degradación de clorofila a.....	69
Grafica 30.	Grafica de medias para degradación de clorofila b.....	70
Grafica 31.	Grafica de medias para reactivación de proteína (POD).....	71
Grafica 32.	Log %AER a 44 y 54°C por 4 y 10 minutos	75
Grafica 33.	Efectos principales para % AER	77
Grafica 34.	Interacción para % Actividad de la enzima residual.....	77
Grafica 35.	Superficie de respuesta estimada para % Actividad de la enzima residual.	78
Grafica 36.	Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila a.....	79

Grafica 37.	Efectos principales para Clorofila a.....	81
Grafica 38.	Interacción para Clorofila a	81
Grafica 39.	Superficie de respuesta estimada para Clorofila a.....	82
Grafica 40.	Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila b.....	82
Grafica 41.	Efectos principales para Clorofila b.....	84
Grafica 42.	Interacción para Clorofila b	85
Grafica 43.	Superficie de respuesta estimada para Clorofila a.....	85
Grafica 44.	Concentración de proteína después del tratamiento según diseño estadístico para aire caliente.	86
Grafica 45.	Curva de calibración de estándar de BSA de 800 – 2000 µg/ml y Concentración de proteína después del tratamiento con aire caliente.....	86
Grafica 46.	Efectos principales para Proteína.	88
Grafica 47.	Interacción para Proteína.....	89
Grafica 48.	Superficie de respuesta estimada para Proteína.	89
Grafica 49.	Días vs % AER. y Grafica 50. Días vs mg/g de Clorofila b.	91
Grafica 51.	Días vs mg/g de Clorofila a.	91
Grafica 52.	Días vs ug/ml de proteína.	91
Grafica 53.	Grafica de medias para reactivación de POD	92
Grafica 54.	Grafica de medias para degradación de clorofila a.....	94
Grafica 55.	Grafica de medias para degradación de clorofila b.....	95
Grafica 56.	Grafica de medias para reactivación de proteína (POD).....	96

LISTA DE DIAGRAMAS

Pág.

Diagrama 1.	Pareto estandarizado para actividad residual.	51
Diagrama 2.	Diagrama de Pareto estandarizado para Clorofila a.	55
Diagrama 3.	Diagrama de Pareto estandarizado para Clorofila b.	59
Diagrama 4.	Diagrama de Pareto estandarizado para proteína.	63
Diagrama 5.	Diagrama de Pareto estandarizada para % Actividad de la enzima residual	76
Diagrama 6.	Diagrama de Pareto estandarizada para Clorofila a.	80
Diagrama 7.	Diagrama de Pareto estandarizada para Clorofila b	84
Diagrama 8.	Diagrama de Pareto estandarizada para Proteína.....	88

RESUMEN

Los mercados actuales demandan mayor vida útil de los alimentos sin haber alterado sus propiedades nutritivas y fisicoquímicas, razón por la cual se buscó la inactivación parcial de la enzima peroxidasa (POD) en brócoli (*Brassicaoleracea* L), por ser una hortaliza de mucha importancia para la canasta familiar. En la inactivación se utilizó como tratamientos térmicos aire caliente e inmersión en agua, los cuales mantuvieron las características del producto, se inactivó parcialmente la enzima POD; los tratamientos se aplicaron realizando una combinación de temperaturas y tiempos de acuerdo al diseño experimental. Para determinar si el tratamiento fue eficiente se cuantificó la actividad de la enzima residual y cantidad de clorofila para determinar la degradación de esta debido a la temperatura, por método espectrofotométrico. Se pudo determinar que el mejor tratamiento fue el realizado con aire caliente a 55°C por 3 horas, donde se presentó mayor reducción en la actividad enzimática con una actividad de la enzima residual del 11%, y con resultados aceptables con inmersión en agua con una combinación de 54°C por 10 minutos con una actividad de la enzima residual del 18%. El tratamiento por aire caliente evitó el amarillamiento, sin alterar el color propio del brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy durante 8 días, con una degradación durante el tiempo de clorofila a del 9,6 % y de clorofila b del 7,9 %, además presentó un 3,8 % de reactivación enzimática expresada como cantidad de proteína y un 53,5 % expresado como actividad de la enzima residual. Luego del tratamiento por inmersión en agua durante el almacenamiento al ambiente presentó una reactivación de la enzima residual del 40 % y del 46,4 % expresado como cantidad de proteína, además una degradación de clorofila a del 6,7 % y de clorofila b del 17,2 %.

Palabras claves: peroxidasa, brócoli, tratamientos térmicos, proteína, clorofila, enzima

ABSTRACT

The current markets demand longer life of foods without having altered their nutritional and physicochemical, reason by which people seek because partial inactivation of the enzyme peroxidase (POD) in broccoli (*Brassica oleracea* L.), because it is a vegetable of great importance to the familiar basket. The inactivation is used as thermal treatment and immersion in water, which retain the characteristics of the product, and also partially inactivate the enzyme POD, the treatments are applied by a combination of temperatures and times according to experimental design. To determine if treatment is effective is measured spectrophotometrically the residual enzyme activity and amount of chlorophyll to determine the degradation of this to the temperature. You can determine the best treatment is performed with hot air at 55 °C for 3 hours, where presents greater reduction in enzyme activity with a residual enzyme activity of 11%, and acceptable results with water immersion and a combination of 54 °C for 10 minutes with a residual enzyme activity of 18%. The hot air treatment prevented yellowing, without altering the color of broccoli (*Brassica oleracea* L.) variety Legacy during 8 days, during the time degradation of chlorophyll a of 9.6% and 7.9% chlorophyll b. Also presented a 3.8% enzymatic reactivation expressed as an amount of enzyme protein and 53.5% expressed as residual enzyme activity. After treatment by immersion in water during the storage environment presented a revival of the enzyme residual of 40% and 46.4% expressed as amount of protein, Besides a degradation of 6.7% chlorophyll a and chlorophyll b 17.2%.

Keywords: peroxidase, broccoli, heat treatment, protein, chlorophyll, enzyme.

INTRODUCCIÓN

El brócoli (*Brassicaoleracea* L), es una hortaliza que en la última década ha presentado una expansión notable en la producción. Es una de las hortalizas que presenta mayores pérdidas de producto, debido a un manejo post-cosecha deficiente, la cual presenta un deterioro ocasionado por la enzima peroxidasa (POD), evidenciado en el deterioro en los floretes de brócoli, presentando coloraciones amarillentas y pigmentación en tonalidades de color negro.

El brócoli (*Brassicaoleracea* L), es un producto cuya comercialización se realiza en fresco y congelado. Según la FAO (2005) el total de exportaciones realizadas fueron de 946.700 toneladas métricas (TM), casi un 62% de las importaciones mundiales de brócoli son de Estados Unidos. Los países que además se destacan como principales importadores son: Reino Unido (29%), Alemania (15%) y Francia (9.12%). Donde el principal exportador a Estados Unidos es México, con una producción de 164.674 TM/año(ORGANIZACION DE AGRICULTURA Y ALIMENTOS, 2005).

El brócoli es una de las verduras que presenta una actividad alta de POD, en comparación con otros productos como el rábano picante, y esta es una hortaliza económicamente importante para el consumidor y la industria, por esta razón se ha realizado estudios donde se describe el procedimiento y la purificación de la peroxidasa, utilizando un método donde se involucra el calor para la inactivación de esta (Forsyth *et al.*, 1998).

La actividad de la peroxidasa es bien conocida por mostrar un aumento del envejecimiento de la planta. La degradación de clorofila sería posiblemente una acción fisiológica importante donde participa la peroxidasa. Como la degradación de la clorofila probablemente se produce en el cloroplasto, la localización de la peroxidasa degradante de clorofila en el cloroplasto sigue siendo objeto de estudio (Naokiet *et al.*, 2004).

La inactivación de las enzimas se utiliza ampliamente en la preservación de alimentos, es deseable que no haya actividad enzimática, pero las enzimas son desnaturalizadas por aplicación prolongada de calor, si esto sucede se podría producir una desorganización total de la estructura de la macromolécula y cambios en el color de la clorofila o de los carotenoides, o el pardeamiento de los alimentos, llevando a alteraciones en sus propiedades sensoriales, de textura y nutricionales (Cruzet *et al.*, 2006).

Diversos tratamientos térmicos como aire caliente, vapor de agua o agua caliente, se han investigado para mantener la calidad de los productos hortofrutícolas y retardar la pérdida de clorofila en los floretes de brócoli (Funamoto *et al.*, 2006).Lurie, (1998), comenta que la inmersión en agua caliente a 43–55°C durante

10 minutos retarda el amarillamiento de brócoli. Funamoto *et al.*, (2002), encontraron que la actividad de las enzimas degradativas de clorofila, como la Chlperoxidasa, Chl oxidasa y la clorofilasa, se redujo por la aplicación de un tratamiento térmico a 50 °C durante 2 h junto con una inhibición del amarillamiento de los floretes.

Es bien sabido que la peroxidasa puede recuperar su actividad después del tratamiento térmico. Muchos estudios han revelado que la peroxidasa después de su reactivación puede causar un deterioro significativo en la calidad de alimentos procesados (Thongsook and Barret, 2005 (a)).

En la utilización del tratamiento por inmersión en agua caliente se ha observado una reducción efectiva en la coloración amarillenta de floretes de brócoli almacenados (Woolfand Ferguson, 1996; Fukumoto *et al.*, 2002). El problema que presenta este método es el riesgo de sumergir los productos en un tanque de agua extremadamente contaminado.

El aire caliente es un sistema de escaldado que opera con aire caliente. El cual se programa a diferentes temperaturas según el grado de escaldado del producto. Se ha observado que este sistema provee un escaldado más eficaz y al mismo tiempo delicado, comparado con métodos como el de inmersión en agua (LINCO journal, 2004)

Describir el procedimiento de inactivación, extracción y cuantificación espectrofotométrica de la enzima POD en brócoli (*Brassica oleracea* L) variedad Legacy, antes y después del tratamiento con aire caliente e inmersión en agua, conservando las características deseables del producto.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En Colombia, el cultivo de brócoli ha tenido un importante incremento en el área cultivada, pasando de 4 Ha en 1997 a 796 Ha en 2008, lo que significa un incremento de 61.8 % anual, los principales departamentos productores son; Antioquia, Cundinamarca, Norte de Santander y Nariño, el rendimiento promedio por ha es de 18.8 ton, comparado con Ecuador que se encuentra entre los 10 principales exportadores de este producto a nivel mundial (MADR, 2008; SICA, 2004).

El brócoli fresco se deteriora rápidamente luego de su cosecha, debido principalmente a su contenido enzimático POD, y al amarillamiento de sus floretes, cuando se almacena a temperatura ambiente. Ya que el brócoli recién cosechado está compuesto por tejidos inmaduros, las inflorescencias muestran rápida senescencia y degradación de clorofila (Fingeret *al.*, 1999).

Según Yoshioet *al.*, (2003), la POD está involucrada en la degradación de la clorofila y es responsable del cambio de coloración, evidenciado por el amarillamiento y la aparición de pigmentos marrones y negros.

La peroxidasa (POD) se ha vinculado con cambios en la coloración de frutas y hortalizas, degradación de compuestos fenólicos con importante valor antioxidante, pérdida de aroma y además es utilizada comúnmente como un índice del adecuado blanqueamiento debido a su alta concentración en los tejidos vegetales (Narvaez, 2008). También ha sido ampliamente usada como indicadora de efectividad del escaldado por su alta tolerancia a tratamientos térmicos; muchos estudios utilizan la enzima POD como indicador del tratamiento térmico aplicado (Anthonet *al.*, 2002; Duarte-Vásquezet *al.*, 2003; Polataet *al.*, 2009; Soysalet *al.*, 2005; Thongsooket *al.*, 2005).

La aplicación de tratamientos térmicos para preservar alimentos es una técnica muy antigua de uso común en la actualidad. Se basa en la destrucción térmica de enzimas, formas vegetativas de microorganismos, y estructuras de reproducción como esporas, con el fin de prolongar la vida útil de los alimentos por varios días (Silvaand Gibbs, 2004).

El brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy es un vegetal de importancia económica para el consumidor y la industria alimentaria, Por ello, se considera importante realizar un estudio de inactivación enzimática de POD en floretes de brócoli, ya que este puede constituirse como alternativa para mantener la calidad, mejorar métodos de conservación y de esta forma hacer notable la vida útil del producto.

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la demanda de brócoli es bastante amplia, sobre todo por parte Estados Unidos, Japón y países de la Unión Europea; esta demanda es suplida en gran parte por México y Ecuador, que son países sobresalientes en la exportación de brócoli (Moreno, 2008).

En el departamento de Nariño, el cultivo de brócoli es una actividad aún incipiente, con un área cultivada de 41 Ha y una producción anual de 543 toneladas, que equivalen a una participación del 3.66% en el total del país. Las principales zonas productoras se encuentran en los municipios de Gualmatan Ipiales y Pasto. Se destaca por ser un cultivo de ciclo corto, que genera mano de obra familiar y se cultiva en pequeñas extensiones o parcelas (MADR, 2008).

El amarillamiento (pérdida de color verde), es un factor clave en la disminución de la vida útil de los productos hortofrutícolas. En brócoli, el amarillamiento de los floretes es la principal limitante de su vida útil (Funamoto *et al.*, 2006).

Entre los agentes causales de este deterioro se encuentra la enzima peroxidasa (POD). Además de tener un importante papel en la fisiología de las plantas, estas enzimas son de gran interés en la tecnología de alimentos, debido a su influencia sobre la calidad de frutas y vegetales crudos y procesados (Morales-Blancas *et al.*, 2002; Robinson, 1991).

También se ha recalcado la relación entre la prevención del desarrollo de sabores residuales y la inactivación de la enzima POD en alimentos congelados (Ndiaye *et al.*, 2009).

Según Yoshio *et al.*, (2003), la Peroxidasa está involucrada en la degradación de la clorofila responsable del cambio de coloración, evidenciado por el amarillamiento y la aparición de pigmentos marrones y negros.

En los últimos años se ha visto incrementado el consumo de brócoli congelado, debido a los cambios de hábitos de los consumidores de las grandes ciudades. El brócoli congelado necesariamente requiere de una etapa de escaldado durante su procesamiento, siendo una etapa crítica para la optimización de la calidad nutricional y sensorial del producto (Gallardo, 2004).

Bahceci *et al.*, (2005), afirman que en los vegetales que son refrigerados o congelados sin tratamiento térmico previo, las enzimas son causantes del deterioro debido a que los sistemas enzimáticos permanecen activos aún a temperaturas inferiores a cero.

Es necesario aclarar que todos estos tratamientos se han aplicado a las variedades de brócoli de importancia comercial en Europa, principalmente la

variedad Itálica, de amplia difusión en los países de ese continente. Sin embargo, no se encuentran reportes de investigación con la variedad Legacy que es la que actualmente se está cultivando con miras a producciones representativas en el departamento de Nariño.

Por lo expuesto anteriormente, se considera de especial importancia esta investigación, como contribución a la agroindustria regional, dado que se podría obtener dos tratamientos térmicos: uno para aplicación a nivel de finca, de utilidad para los productores que deseen enviar aquellos productos que no cumplan con las normas de la empresa al mercado en fresco y otro para procesamiento industrial, con resultados adecuados a su producto y variedad.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de dos tratamientos térmicos en la inactivación parcial de la enzima Peroxidasa en floretes de brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy, permitiendo extender su vida comercial.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Cuantificar la acción de la enzima peroxidasa en brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy, antes y después de la aplicación de los dos tratamientos térmicos.
- ✓ Determinar la cantidad de proteína presente en el extracto enzimático de brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad legacy.
- ✓ Determinar el tratamiento óptimo que permita el mayor tiempo hasta el amarillamiento de floretes de brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy en condiciones ambiente.

4. MARCO TEORICO

4.1. BROCOLI

Legacy es un híbrido de brócoli con planta de gran vigor y alto potencial de rendimiento, los tallos son fuertes y prácticamente sin ramificaciones laterales, las cabezas son domos bien formados, de grano liso, por tanto se adaptan muy bien en mercado fresco o para ser procesado. Se adapta aun mejor en regiones de clima fresco, por lo cual se ha ganado la preferencia de los productores (Seminis, 2009).

La variedad Legacy ha tenido un buen desarrollo en las regiones productoras de brócoli en Ecuador; la razón principal es que se adapta con excelentes resultados en zonas altas. Esta variedad se caracteriza por tener una pella bien formada que permite cortes de tallos relativamente cortos, con floretes (cabezas) de consistencia firme, de grano pequeño, forma adecuada y un color verde - grisáceo (SICA, 2004).

Figura 1. Floretes de brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy



Fuente: esta investigación

Según el CODEX ALIMENTARIUS, en la norma que se aplica al brócoli congelado rápidamente, debe ser un producto preparado a partir de tallos o vástagos frescos, limpios y sanos, que se ajusta a las características de la especie *Brassicaoleracea* L. que han sido clasificados, recortados, lavados y escaldados suficientemente para lograr una estabilidad adecuada de color y sabor durante los ciclos normales de comercialización, destinados al consumo directo (CODEX ALIMENTARIUS., 1981)

El cultivo de hortalizas se encuentra ampliamente difundido a lo largo de Colombia, con una producción hortícola nacional muy heterogénea y dispersa. Se

cultivan aproximadamente 42 especies, en los diferentes pisos térmicos del país. En cada una de las regiones del país la actividad hortícola es muy variada, tanto por la estructura de sus cultivos, como por sus particulares sistemas de producción y por las cantidades de hectáreas que se cultivan, y por consiguiente la importancia económica que representa para cada una de ellas (Vallejo, 2004).

El brócoli representa el 2.5% de la superficie cultivada, el 2.9% del volumen total de producción, el 6.2% del valor de la producción y participan con cerca del 10% del empleo generado en el sector (Rodríguez, 2008).

El brócoli en Colombia genera grandes retos para la agricultura y la investigación.

En la producción de brócoli, Colombia tiene un gran potencial debido a su diversidad agroclimatológica que permite la producción continua y escalonada, que incluye la aclimatación de la planta que se puede usar para predecir cosechas de diferentes condiciones ambientales (Olesen and Grevsen, 2000), y su situación geográfica cercana a centros grandes de consumo con distribución por tierra, mar y aire (Jaramillo, 2000).

Propiedades del brócoli

Las hortalizas son ricas en vitaminas, minerales, fibra, en menor medida almidón y azúcares, hecho que explica su bajo aporte calórico. Son fuente indiscutible de sustancias de acción antioxidante, por todo ello se consideran fundamentales para la salud e indispensables dentro de la alimentación y de la industria. (ICBF, 2011; Alimentacion Sana y Natural, 2007)

El brócoli está compuesto en su mayoría por agua, por lo que su valor calórico es muy bajo. Tiene una gran importancia desde el punto de vista nutricional, por su variedad y cantidad vitamínica, es fuente excelente de vitamina C, ácido fólico, niacina, y de provitamina A (beta-caroteno), vitamina B1 y E.

Cuadro1: Análisis nutritivo y calórico, realizado en base a una porción de 100g de brócoli.

Humedad	88.90 g
Energía	41 kcal
Proteína	4.00 g
Lípidos	0.30 g
Carbohidratos Totales	5.60 g

Sales minerales	
Calcio	106.00 mg
Fosforo	137.00 mg
Hierro	1.10 mg

Vitaminas Hidrosolubles	
Tiamina	0.07 mg
Riboflavina	0.14 mg
Niacina	0.90mg
Vitamina C	100.00 mg
Vitamina A1	75.00 mg

Vitaminas Liposolubles	
Vitamina A1	75.00 mg

Fuente:(ICBF, 2011)

En los últimos años, en brócoli se han identificado una serie de elementos fitoquímicos que sirven en la prevención de diversos tipos de cáncer y otras enfermedades por su concentración de selenio reduce la mortalidad en humanos, lo cual justifica el creciente interés en su consumo y cultivo, tanto como producto fresco como congelado (Alimentación Sana y Natural, 2007; Schrauzer *et al.*, 1997).

El brócoli presenta diversos compuestos entre los que destacan los glucosinolatos, isotiocianatos, indoles o fibra, fenólicos y antioxidantes entre otros. Muchos de estos compuestos son azufrados y son responsables del fuerte olor que desprende esta verdura durante su cocción (Finley *et al.*, 2001).

4.2. ENZIMAS

Las enzimas son moléculas catalizadoras biológicas que actúan con reacciones bioquímicas a velocidades altas y con un elevado grado de especificidad, sobre moléculas denominadas sustratos; en su ausencia, la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían (Badui, 1999).

El sustrato debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como tal. La especificidad puede ser estereoquímica (isómeros L o D como sustratos), baja especificidad (atacan un determinado enlace químico), especificidad de grupo (un enlace y grupo químico específico al lado de éste) y especificidad absoluta (una sola sustancia)(Badui, 1999).

La inactivación de las enzimas se utiliza ampliamente en la industria alimentaria; en la mayor parte de los casos de preservación de alimentos, es deseable que no haya actividad enzimática; si ello ocurriera se podría producir un cambio en el color de la clorofila o de los carotenoides, o el pardeamiento de los alimentos, llevando a alteraciones en sus propiedades sensoriales, de textura y nutricionales (Cruzet *al.*, 2006).

Las isoenzimas constituyen formas moleculares múltiples de una misma enzima que catalizan fundamentalmente la misma reacción, pero difieren en sus propiedades químicas, físicas, estructurales o inmunoquímicas. Su diferencia radica en la estructura primaria de su proteína, ocurriendo como dímeros o tetrámeros.

Están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas o subunidades. Cada isoenzima de una misma familia puede presentar diferente afinidad por los sustratos, de modo que la constante de MichaelisMenten (k_m) y la especificidad pueden variar, e igualmente ser inhibidas diferencialmente por agentes específicos y en sus propiedades físicas y químicas tales como termoestabilidad, carga eléctrica y composición de aminoácidos (Maestre, 2004).

Las enzimas pueden ser desnaturalizadas por varios medios, entre ellos el calor. La mayoría de las enzimas son, por lo tanto termolábiles y generalmente una temperatura de 70 a 80 °C durante 2 a 5 minutos basta para inactivarlas. El efecto desnaturalizante de la temperatura se produce al desorganizar totalmente la estructura de la macromolécula, provocándole muchos cambios de solubilidad (coagulación), color, digestibilidad, entre otros (Cruzet *al.*, 2006).

Las enzimas se encuentran presentes en todos los alimentos en diferentes tipos y cantidades las cuales van relacionadas con los componentes fisiológicos del alimento. La peroxidasa, enzima que se encuentra en mayor proporción en brócoli ha sido la base de diferentes estudios realizados los cuales conllevan a mejorar métodos de conservación.

4.2.1. Peroxidasa(POD).La Peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) es una hemoproteína, monomérica, glicosilada y contiene un grupo prostético heme, que cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustratos entre los que se encuentran fenoles (guayacol, *p*-cresol), aminas aromáticas (anilina, *o*-dianisidina), y algunos otros compuestos orgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno (Carvalho *et al.*, 2003; Duarte-Vásquez *et al.*, 2003; Polata *et al.*, 2009; Yemenicioglu *et al.*, 1998).

Figura 2. Estructura de la enzima Peroxidasa



Fuente: bioinformatica.upf.edu/.../Ey/GPXhumanas.html

La POD, principalmente en forma de isoenzima, es una de las enzimas más termoestables. Es responsable por desarrollar la oxidación de electrones en una gran variedad de compuestos, en presencia de peróxido de hidrógeno.

En las células vegetales la POD se encuentra en isoformas solubles y ligadas iónicamente con distintos pesos moleculares, puntos isoeléctricos (pI), especificidad de sustratos y estabilidad térmica (Forsyth *et al.*, 1999; Forsyth *et al.*, 1998; Polata *et al.*, 2009; Tijskens *et al.*, 1997; Yemenicioglu *et al.*, 1998). Además una fruta puede contener diferentes isoenzimas con puntos isoeléctricos muy distintos (Estrada *et al.*, 2000). Los mismos autores las clasifican de acuerdo con su punto isoeléctrico en ácidas y básicas pero Thongsook *et al.*, (2005) reportan además la presencia de peroxidasa básica en brócoli.

La peroxidasa (POD) se ha vinculado con cambios en la coloración de frutas y hortalizas, degradación de compuestos fenólicos con importante valor antioxidante y pérdida de aroma. (Narvaez, 2008). Además, ha sido ampliamente usada como indicadora de efectividad del escaldado por su alta tolerancia a tratamientos térmicos.

La POD cataliza la reacción dependiente de oxígeno utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno que transforma *o*-difenoles en *o*-quinonas, estas son

especies reactivas y capaces de modificar covalentemente un amplio abanico de especies nucleófilas del interior de las células, que conduce a la formación de pigmentos marrones o negros (Duarte *et al.*, 2005; Hansberg, 2002).

Debido a su alta resistencia térmica (termo estabilidad), muchos estudios utilizan la enzima peroxidasa como indicador del tratamiento térmico aplicado. Además, es utilizada comúnmente como un índice del adecuado blanqueamiento de frutas y vegetales debido a su alta concentración en los tejidos vegetales (Goncalves *et al.*, 2009; Polata *et al.*, 2009; Duarte-Vásquez *et al.*, 2003; Anthon *et al.*, 2002; Soysa *et al.*, 2005; Thongsook *et al.*, 2005).

También se utiliza como indicador en las operaciones de congelación de frutas y hortalizas debido a su alta concentración en la mayoría de tejidos, su alta estabilidad térmica y facilidad de ensayo (Anthon *et al.*, 2002). Bahceci *et al.*, (2005) afirman que los tratamientos térmicos previos a la refrigeración y congelación de alimentos, son necesarios pues los sistemas enzimáticos permanecen activos aún a temperaturas de congelación.

Sin embargo, el tratamiento térmico de los vegetales ha llevado también a la pérdida de características deseables como color, textura, flavor y nutrientes. Por esta razón, es deseable mantener el tratamiento térmico a un mínimo suficiente para inactivar completamente las enzimas, conservando las características deseables del producto.

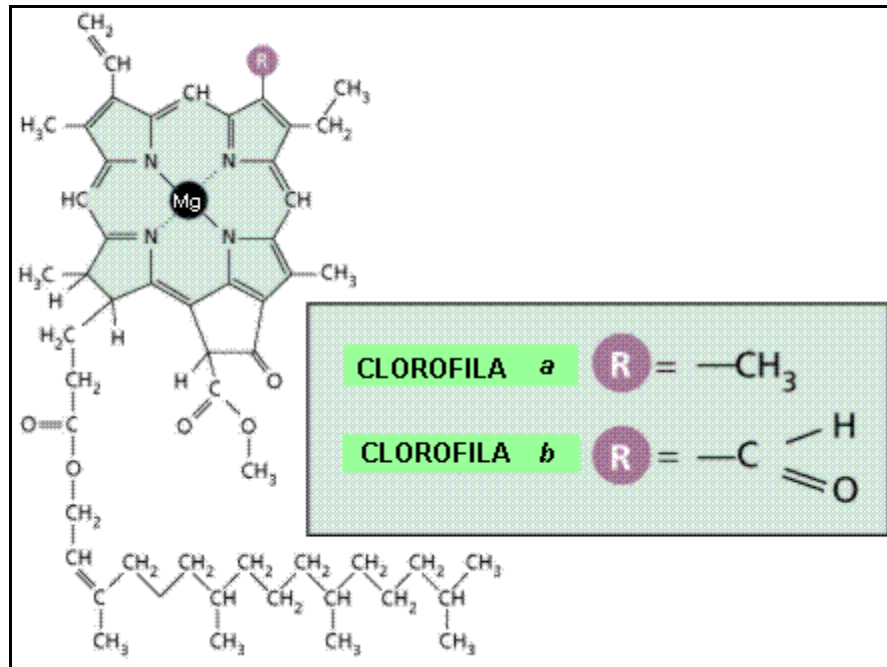
4.3. CLOROFILA.

Uno de los parámetros más importantes en la calidad de un alimento es su color. El mismo está relacionado con la presencia de pigmentos en los tejidos. Uno de los compuestos responsables del color en los alimentos es la clorofila, relacionada al color verde en los vegetales (Schmalko *et al.*, 2003).

El término clorofila indica una serie de pigmentos fotosintéticos porfirínicos. Esto significa que su estructura presenta un esqueleto tetra pirrólico conjugado. Se encuentra en los tejidos foliares en clorofila a, clorofila b y carotenoides. Las clorofilas a y b se encuentran en los cloroplastos de las plantas superiores. Dentro de los cloroplastos las clorofilas se hallan entre una capa de lípidos y proteínas (Bermudez *et al.*, 1995).

Las clorofilas tienen un átomo de magnesio enlazado centralmente en el anillo tetrapirrólico, además de un grupo fitólico (cola de 20 átomos de carbono) esterificado a un grupo propiónico en el anillo IV. La clorofila a tiene un grupo metilo en el anillo II y la b un formilo. (Rodés G. *et al.*, 2006)

Figura 3. Estructura de clorofilas a y b



Fuente: www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_11.html

Las clorofilas son de color verde, las feofitinas son de color verde pardusco, la transformación de las clorofilas en feofitinas se favorece por los tratamientos térmicos en medio ácido (Bermudez *et al.*, 1995).

Para conservar los alimentos se realizan normalmente una serie de tratamientos térmicos, que producen una disminución importante de la concentración de clorofilas y la correspondiente pérdida de color (Schmalko *et al.*, 2003).

La degradación de las clorofilas por efecto del calor, crea grandes problemas a la industria de alimentos. La utilización de tratamientos a elevada temperatura por tiempos cortos (HTST), tampoco son muy ventajosos ya que a pesar que se obtienen colores verdes muy atractivos inicialmente, este se deteriora durante el almacenamiento (Bermudez *et al.*, 1995).

El calentamiento de materiales que contienen clorofila produce también isomerizaciones dentro de la molécula, que pueden llegar a afectar hasta el 10% del contenido en el cocinado normal o en el escaldado de vegetales verdes. Esta isomerización carece de importancia desde el punto de vista alimentario (Calvo, 2009).

Los floretes de brócoli se vuelven amarillos durante el almacenamiento debido a la pérdida de color verde que se produce con la degradación de la clorofila (Naokiet *et al.*, 1997)

La pérdida de color verde, es un factor importante en la calidad postcosecha. El florete de brócoli amarillo, es una importante limitación a la vida útil (Funamoto *et al.*, 2006).

Los pigmentos son compuestos solubles en solventes no polares y se localizan, formando complejos pigmento-proteína, en la fase lipídica de las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Por esta razón los pigmentos no pueden ser extraídos del tejido foliar con soluciones buffer acuosas pero si con un solvente orgánico. La extracción de tejidos foliares con solventes orgánicos contienen clorofila a, clorofila b y carotenoides (Rodés G. *et al.*, 2006).

4.4. TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

Los tratamientos térmicos estabilizan productos porque tienen la capacidad para destruir microorganismos e inactivar enzimas (Cruz *et al.*, 2006).

Los tratamientos térmicos se utilizan comúnmente para inactivar enzimas, sin embargo, es bien sabido que la peroxidasa puede recuperar su actividad después del tratamiento. Muchos estudios han revelado que la peroxidasa después de su reactivación puede causar un deterioro significativo en la calidad de alimentos procesados (Thongsook *et al.*, 2005).

Entre los tratamientos térmicos más usados para inactivar las enzimas y mejorar la conservación de los alimentos con mínimas pérdidas en su valor nutricional, se encuentra el escaldado. Se define como una operación unitaria que consiste en la inmersión de los alimentos en agua a temperatura de ebullición durante un tiempo breve, que conserva los alimentos por inactivación de sus enzimas y destrucción de los microorganismos relativamente termosensibles. Se realiza con el fin de disminuir las poblaciones de microorganismos (90%), y para inactivar las enzimas que modifican el sabor y el color de ciertos alimentos (Fernandez, 2004; Mafart, 1994).

El escaldado en brócoli persigue distintos objetivos, uno de ellos es inhibir las reacciones enzimáticas indeseables, por destrucción térmica de las enzimas responsables presentes, que en otro caso darían lugar a aromas, sabores o coloraciones extrañas, provocando un efecto adverso en la calidad y valor nutritivo del producto (Gallardo, 2004).

El escaldado emplea generalmente temperaturas por debajo del punto de ebullición (en cualquier tipo de alimento), ya que en la mayoría de los casos las temperaturas superiores a este valor afectan irreversiblemente ciertas

características físicas y químicas del producto alimenticio; por ejemplo, cambio de sabor, pérdida de nutrientes por disolución como sales minerales, vitaminas hidrosolubles y otros componentes solubles en agua. (Lewis *et al.*, 2004).

El aire caliente es un sistema de escaldado que opera con un flujo controlado de aire caliente, y este sistema elimina la necesidad de sumergir los productos en un tanque de agua extremadamente contaminado. El aire caliente se programa a diferentes temperaturas según el grado de escaldado del producto. Es la combinación de aire caliente circulado y vapor saturado, sirve para mantener la temperatura. Este nuevo sistema provee un escaldado más eficaz y al mismo tiempo delicado, comparado con métodos convencionales (LINCO journal, 2004).

4.5. METODOLOGIAS PARA INACTIVACIÓN Y DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA

4.5.1. Obtención del extracto enzimático. Varias investigaciones han trabajado en la obtención del extracto enzimático de POD en brócoli, el cual se lleva a cabo a 4 °C con 250 g de floretes de brócoli (*Brassica oleracea* L) variedad Itálica, homogenizados en un procesador de alimentos con buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0. El extracto se filtra a través de gasa y se centrifuga a 12000rpm durante 15 minutos el filtrado se utiliza como extracto enzimático (Duarte *et al.*, 2007; Goncalves *et al.*, 2009; Thongsook *et al.*, 2005; Thongsook *et al.*, 2007).

4.5.2. Medición de la actividad enzimática de la peroxidasa. La actividad de POD se estima por la medida del incremento de la absorbancia a 470 nm (Halpin, *et al.*, 1989), donde se lleva a cabo la oxidación del guayacol en tetrahidroguayacol en presencia de peróxido de hidrogeno (Sessa *et al.*, 1981). La POD posee una alta resistencia térmica y por lo tanto su presencia se utiliza para monitorear la calidad del tratamiento térmico y en consecuencia, la estabilidad del alimento procesado (Machado and Saraiva, 2002).

La cinética de inactivación térmica de la peroxidasa en productos horto-frutícolas ha sido muy estudiada y está constituida por dos fases, cada una de las cuales caracterizada por una cinética de primer orden. Esas dos fases se deben a la existencia de isoenzimas de diferentes estabilidades térmicas, las cuales pueden ser lábiles o resistentes al calor (Avallone *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta que la enzima POD está presente en frutas y hortalizas, responsable de grandes pérdidas en post-cosecha, por esta razón se han realizados diversos estudios para la determinación de su actividad enzimática.

la actividad enzimática en sandía fue determinada, en un erlenmeyer de 50 ml adicionando 20 mL de tampón fosfato 0,2M, pH 6,0 y 2 mL de extracto enzimático, luego se llevó a baño-maría a 25°C hasta estabilizar la temperatura.

Posteriormente se adicionó 1 mL de guayacol al 0,5% y 1 mL de H₂O₂ al 0,08%, se homogenizó rápidamente y se realizó 10 lecturas, una por minuto, en espectrofotómetro a 470 nm utilizando como blanco la mezcla reactiva sin peróxido de hidrógeno (Avallone *et al.*, 2000).

La actividad de peroxidasa en hojas de menta se midió por absorbancia a 470 nm por 20 min, utilizando una solución de sustrato que contuvo 0.1 ml de guayacol, 0.1 ml de H₂O₂ al 30% y buffer fosfato de potasio 0.1M pH 6.5. Para las lecturas se tomó 3.48 ml de la solución de sustrato y se adicionó 0.12 ml de enzima (Rudra *et al.*, 2008).

La actividad de POD en Brócoli (*Brassicaoleracea* L.) variedad Itálica se midió espectrofotométricamente, El extracto enzimático se mezcló con guayacol y H₂O₂ como sustrato. Se midió el incremento de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro UV / Vis, ATI Unicam. La unidad de actividad de la enzima fue la cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbancia por minuto, por ml de extracto de muestra. La actividad enzimática se expresó en unidades de actividad/g de tejido fresco. La actividad enzimática inicial se determinó en muestras de producto fresco (Goncalves *et al.*, 2009).

Según el Sistema Internacional de Unidades (SI) Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama katal (símbolo kat), es oficial desde la 21ª Conferencia General de Pesos y Medidas de 1999 con resolución número 12 que dice “se adopta el nombre específico katal, símbolo kat para el SI, de unidades mol por segundo para expresar actividad catalítica, especialmente en la medicina y la bioquímica” y recomienda “que cuando se use el katal, se especifique el procedimiento de medición donde se debe identificar el indicador de reacción”(IUPAC, 2001)

Como 1 mol son 10⁶ µmoles y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a 60 x 10⁶ U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal (µkat, 10⁻⁶kat) o el nanokatal (nkat, 10⁻⁹kat)(www.ehu.es).

4.6. METODOLOGÍAS PARA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS

La clorofila se extrae de 1 g de material vegetal con 5 mL de acetona al 80% en agua; después de centrifugación se mide la absorbancia del sobrenadante en una cubeta de 1cm a 663 y 646 nm, para clorofilas a y b respectivamente. Las absorbancias se miden en un espectrofotómetro. Las concentraciones de clorofilas se calculan a partir de la Ecuación 2.

$$\text{Total chlorophyll (mg L}^{-1}\text{)} = 17.3 (\text{abs } 646 \text{ nm}) + 7.18 (\text{abs } 663 \text{ nm}) \quad \text{Ecuación 1}$$

A partir de estos resultados se determina la clorofila y se expresa como mg kg^{-1} de peso fresco (Griffiths *et al.*, 1998; Percival, 2000).

Rodés & Collazo, (2006) describen la extracción de los pigmentos fotosintéticos, donde se tomó una muestra de 1 gramo, se maceró con 5 g de arena reactivo y 1,25 g de bicarbonato de magnesio, con el fin de mantener el pH ligeramente alcalino; se adicionó acetona al 80% sin sobrepasar los 30 mL y se continuó con la trituración, se filtró el extracto en un sitio sombreado.

El matraz se enrasó hasta 50 ml con solución de acetona al 80%, posteriormente se llevó a centrifugación a 10,000 rpm por 5 minutos, se tomó el sobrenadante como extracto fotosintético. La cantidad de clorofila se determinó por un control de absorbancia, a una longitud de onda de 663 y 645 nm. La mezcla de reacción final contenía 5 ml de extracto fotosintético, previamente diluido 10 veces, se utilizó acetona al 80% como blanco. La concentración de pigmentos se calculó mediante las ecuaciones de Mackinney (1941).

$$\text{Clorofila a} = 12,7A_{663} - 2,69 A_{645} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Clorofila b} = 22,9A_{645} - 4,68 A_{663} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde se expresa la concentración de clorofila en mg/gr de peso fresco.

4.7. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE LA PROTEÍNA PEROXIDASA.

El contenido de proteína se midió utilizando el reactivo Bio-Rad proteína, como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) en varias concentraciones (0-250 mg/L). El extracto preparado para actividad de POD se diluyó cuatro veces en buffer. Un volumen de 15 μL de estándar o extracto, 250 μL de diluyente (1:5) Bio-Rad proteína (reactivo) se añadió a cada microplaca de fondo plano EIA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la lectura de absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas plus SpectraMax 384. (Fukumoto *et al.*, 2002).

La determinación de cantidad de la proteína POD, se realizó basándose en el método de Bradford, como analito se tomó el extracto enzimático, para realizar la curva de calibración se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de proteína, se midió la absorbancia a 595 nm. (Agostini *et al.*, 1997; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2003; Duarte-Vásquez *et al.*, 2003; Cano *et al.*, 1996)

5. DISEÑO METODOLÓGICO

Para evaluar los tratamientos térmicos para la inactivación de la enzima peroxidasa fue indispensable establecer unos protocolos de extracción y cuantificación enzimática, basados en literatura y adecuados a las condiciones de la muestra de brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy, los cuales se encuentran definidos y se utilizan para llevar a cabo el cumplimiento de los objetivos de la investigación.

5.1. PROCEDENCIA DE LA MUESTRA DE BRÓCOLI

La muestra de brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy, utilizada en la investigación se obtuvo directamente del canal de comercialización en el municipio de Pasto, previamente identificado al proveedor.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la inactivación de la enzima POD en brócoli (*Brassicaoleracea* L), variedad Legacy, se elaboró un Diseño de composición central más puntos estrellas, con metodología Superficie de Respuesta el cual se consideran los efectos de 2 factores que influyen sobre las variables de respuesta en 36 corridas. El diseño es corrido en 3 bloques. El orden de los experimentos es completamente aleatorizado. Esto aporta protección contra el efecto de variables ocultas. El diseño se aplicó para cada uno de los tratamientos. El análisis estadístico de los datos se realizó con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XV.

El diseño contiene los siguientes atributos:

Número de factores experimentales: 2 (Temperatura y Tiempo)

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 4 (actividad de la enzima residual, concentración de clorofila a, concentración de clorofila b, concentración de proteína)

Número de corridas: 36, incluyendo 4 puntos centrales por bloque

Grados de libertad para el error: 28

Aleatorizar: Sí

Cuadro2. Factores experimentales para tratamiento con aire caliente

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuo
Temperatura	48,0	55,0	°C	Sí
Tiempo	1,0	3,0	Horas	Sí

Fuente: esta investigación

Cuadro3. Factores experimentales para tratamiento por inmersión en agua

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Unidades</i>	<i>Continuo</i>
Temperatura	44,0	54,0	°C	Sí
Tiempo	4,0	10,0	min.	Sí

Fuente: esta investigación

Cuadro4. Variable de respuesta para tratamiento con aire caliente e inmersión en agua.

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
%AR	
Clorofila a	mg/g
Clorofila b	mg/g
Proteína	µg/ml

Fuente: esta investigación

Cuadro5: Matriz del diseño para escaldado por inmersión en agua.

Bloque	Temperatura	Tiempo
1	49	11,2
1	44	10
1	44	4
1	42	7
1	56	7
1	49	7
1	49	7
1	49	7
1	49	7
1	54	4
1	54	10
1	49	2,7
2	49	11,2
2	44	10
2	44	4
2	42	7
2	56	7
2	49	7
2	49	7
2	49	7
2	49	7
2	54	4
2	54	10
2	49	2,7
3	49	11,2
3	44	10
3	44	4
3	42	7
3	56	7
3	49	7
3	49	7
3	49	7
3	49	7
3	54	4
3	54	10
3	49	2,7

Cuadro6: Matriz del diseño para escaldado con aire caliente.

Bloque	Temperatura	Tiempo
1	52	0,5
1	52	2
1	55	3
1	48	3
1	52	2
1	56	2
1	52	2
1	55	1
1	52	3,4
1	52	2
1	48	1
1	47	2
2	52	0,5
2	52	2
2	55	3
2	48	3
2	52	2
2	56	2
2	52	2
2	55	1
2	52	3,4
2	52	2
2	48	1
2	47	2
3	52	0,5
3	52	2
3	55	3
3	48	3
3	52	2
3	56	2
3	52	2
3	55	1
3	52	3,4
3	52	2
3	48	1
3	47	2

5.2.1. Análisis estadístico. El análisis de resultados se realizó utilizando la técnica de análisis de varianza con lo que determino la significancia estadística de los factores sobre las variables de respuesta, por medio de:

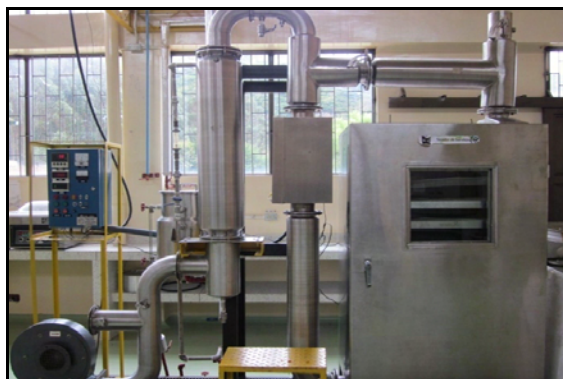
- ✓ Cuadro ANOVA
- ✓ Diagrama de Pareto
- ✓ Grafica de Efectos Principales
- ✓ Grafica de interacción
- ✓ Superficie de Respuesta

5.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS.

Para la inactivación de la enzima POD se utilizó temperaturas teniendo en cuenta los factores que influyen sobre la actividad enzimática, (previamente comprobado) y tiempos determinados en base a estudios revisados, que establecen Temperaturas entre 48 y 55°C y tiempos entre 1 y 3 horas para tratamiento con aire caliente y temperaturas entre 44 y 54 °C y tiempos entre 4 y 10 minutos para tratamiento por inmersión en agua (Cruz *et al.*, 2006; Goncalves *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2004; LINCO journal, 2004; Lurie, 1998; Thongsook *et al.*, 2005; Thongsook *et al.*, 2007) y siguiendo la matriz experimental (Cuadro 5 y 6) del diseño experimental.

La unidad experimental de tratamiento con aire caliente consistió en introducir en un secador de bandejas FIQ-LTDA - CST-800 (Figura 4) muestras de 15 g de floretes, en una bolsa perforada de polietileno de alta densidad, con una área superficial de 1000 cm² con 56 perforaciones circulares de 0.5 cm de diámetro, con el fin de evitar pérdida de peso del producto, luego del tratamiento del producto se realizó el choque térmico con aire frío a -23°C en un congelador LG GC-P207BSRV (Figura 5) (Lurie, 1998).

Figura 4. Secador de bandejas FIQ-LTDA - CST-800.



Fuente: esta investigación

Figura 5. Congelador LG GC-P207BSRV.



Fuente: esta investigación

El tratamiento térmico aplicado de inmersión en agua se realizó de acuerdo a la literatura consultada y consistió en muestras de 15 g de floretes, sumergidos completamente en un baño termostático EYELA N1001S-WD 115V, posteriormente se realizó el choque térmico en agua con hielo a una temperatura de 0 °C.(Goncalves *et al.*, 2009; Sanjuanet *et al.*, 2000; Schmalkoet *et al.*, 2003).

Figura 6. Baño termostático EYELA N1001S-WD 115V



Fuente: esta investigación

Figura 7. Choque térmico



Fuente: esta investigación

5.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.

Para realizar la extracción de la enzima se utilizó la metodología planteada por Duarte et al, (2007) con algunas modificaciones. Las muestras se licuaron en un procesador de alimentos KALLEY K-HB150 (Figura 8) con buffer fosfato a una concentración de 50 mM, pH 6.5 a una relación de entre buffer y brócoli de 4:1 (mL de buffer:gr de brócoli). Se filtró a través de un lienzo, posteriormente se llevó a centrifugación a 10.000 rpm (figura 9.) por 15 minutos a 4°C, utilizando tubos falcón de 15 mL; el sobrenadante se utilizó como extracto enzimático (Figura 10).

Figura 8. Procesador de alimentos KALLEY K-HB150



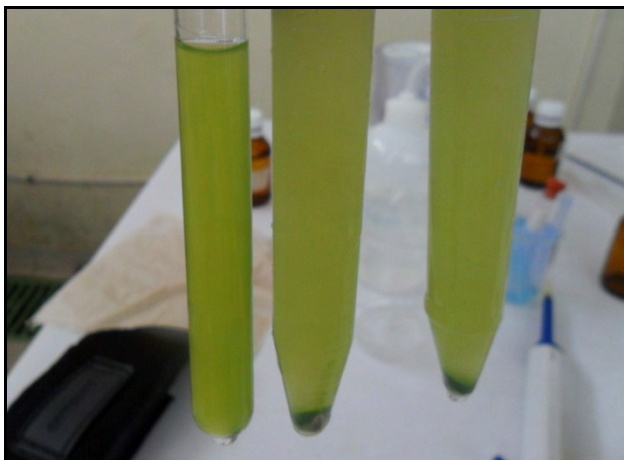
Fuente: esta investigación

Figura 9. Centrifuga



Fuente: esta investigación

Figura 10. Extracto enzimático



Fuente: esta investigación

5.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática POD en brócoli se determinó por un control en el cambio de absorbancia, a una longitud de onda de 470 nm (Thongsook and Barrett, (a), 2005).

La actividad enzimática se determinó como el cambio de absorbancia por min (Abs/min) bajo las condiciones de ensayo a 25°C. Para calcular el Abs/min usando regresión lineal, la actividad enzimática en porcentaje es el cociente del cambio de absorbancia por minuto después (S) y antes (S₀) del tratamiento térmico, $(S / S_0) * 100$ (Rudra et al., 2008).

La actividad de la enzima residual (AER) fue determinada como (A/A0) donde: A = actividad enzimática después del tratamiento térmico y A0 = actividad enzimática antes del tratamiento térmico (Matsui et al., 2007).

$$\%AER = (A/A0) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Una vez obtenido el extracto enzimático se mantuvo en un ambiente oscuro y a 4°C hasta su cuantificación espectrofotométrica, para lo cual las cantidades y concentraciones utilizadas en cada muestra se encuentran en el Cuadro 7. Según el protocolo planteado por Thongsook and Barrett, (a) (2005), con algunas modificaciones para medición de POD en brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy.

Cuadro 7. Protocolo de cuantificación.

Reactivos	Cantidad
Buffer Fosfato 0,2 M pH 7.0	2300 µl
Guayacol 0,5%	500 µl
Peróxido de Hidrogeno 0.5%	180 µl
Extracto Enzimático	20 µl

Fuente: esta investigación

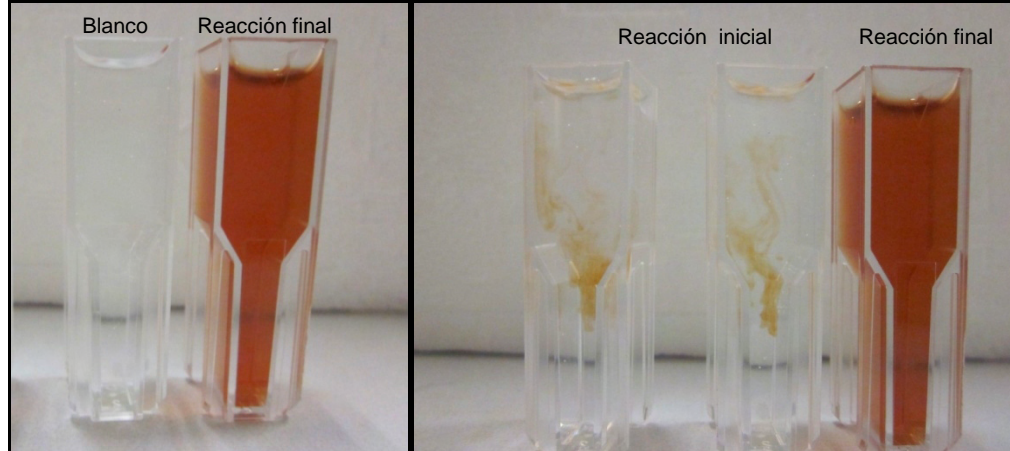
La determinación enzimática se realizó por método espectrofotométrico a una longitud de onda de 470 nm, en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC - GENESYS 10 UV-VIS (Figura 11) durante 40 minutos con intervalos de tiempo de 30 segundos. Como blanco se utilizó los reactivos del protocolo de cuantificación reemplazando el extracto enzimático por agua (figura 12)).

Figura 11. Espectrofotómetro GENESYS 10 UV-VIS



Fuente: esta investigación

Figura 12. Reacción de POD

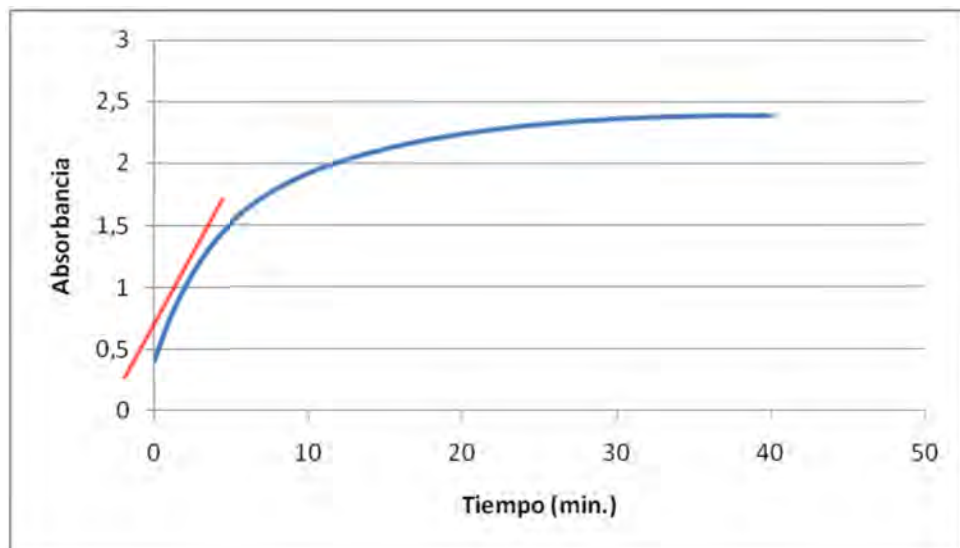


Fuente: esta investigación

La actividad enzimática se determinó como el cambio de absorbancia por min (Abs/min) bajo las condiciones de ensayo a temperatura ambiente. Para la actividad residual de POD se hizo uso de la regresión lineal, tomando de la curva de cinética enzimática (Grafica 1) obtenida de sus absorbancias en el tiempo, la parte lineal de la curva, la cual se encuentra en un rango de 0 a 5 minutos de su actividad enzimática en el tiempo (Grafica 2)

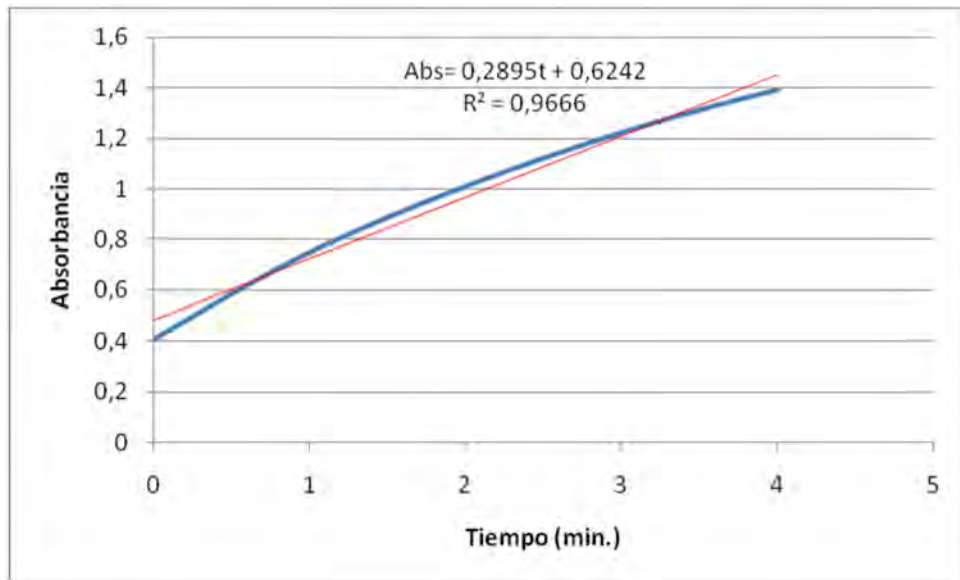
De la regresión lineal se toma la pendiente la cual representa la actividad enzimática expresada en kat., la cual es utilizada para calcular el %AER con la ecuación 1

Grafica 1. Actividad enzimática en el tiempo



Fuente: ésta investigación

Grafica 2. Tendencia lineal de actividad enzimática



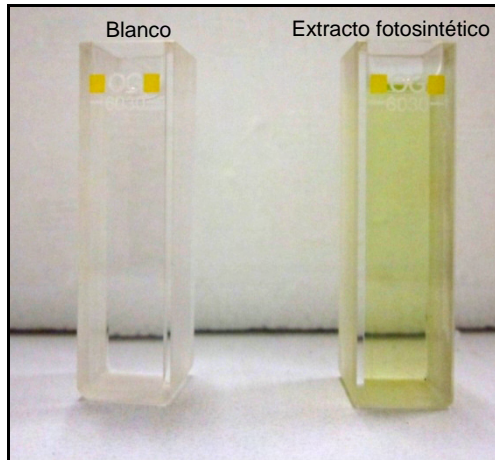
Fuente: ésta investigación

Esta grafica indica la relación lineal que presenta la absorción por minuto en los primeros 4 minutos de reacción, en la que indica la actividad enzimática en katalase de POD en brócoli (*Brassicaolerace* L) variedad Legacy sin tratamiento; de la ecuación lineal se obtiene $A_0 = 0,2895$ que representa la pendiente de la recta; de la misma forma se toma las graficas de los tratamientos y de ellas se obtiene las pendientes de las ecuaciones lineales que representan A; estos son los valores que tomamos para realizar las operaciones en la ecuación 1 y así obtener %AER.

5.6. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS (CLOROFILA).

Para la extracción de los pigmentos fotosintéticos se tomó una muestra de 1 gramo de florete de brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy en un mortero; se maceró con 5 g de arena reactivo y 1,25 g de bicarbonato de magnesio, se adicionó acetona al 80% sin sobrepasar los 30 mL y se continuó triturando, se filtró el extracto en un sitio sombreado. Se enrasó el matraz hasta 50 mL con solución de acetona al 80%, posteriormente se llevó a centrifugación a 10,000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se tomó como extracto fotosintético (Rodés G. *et al.*, 2006)

Figura 13. Extracto de pigmentos fotosintéticos



Fuente: esta investigación

5.7. CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CLOROFILA

La cantidad de clorofila en brócoli se determinó por un control en el cambio de absorbancia, a una longitud de onda de 663 y 645 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV-VIS. La mezcla de reacción final contenía 5 ml de extracto fotosintético, previamente diluido 10 veces, se utilizó acetona al 80% como blanco.

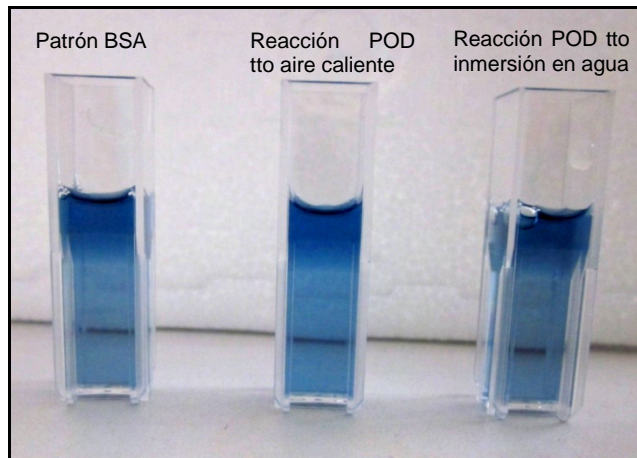
La concentración de pigmentos se calculó mediante las ecuaciones de Mackinney (1941), expresando la concentración de clorofila en mg/g de peso fresco.

5.8. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE LA PROTEÍNA PEROXIDASA.

La determinación de cantidad de la proteína POD en floretes de brócoli (*Brassica oleracea* L), variedad Legacy, se realizó basándose en el método de Bradford (1976), (Fukumoto *et al.*, 2002)

La mezcla de reacción contenía 50 μ L del estándar de proteína de BSA para la curva patrón y 50 μ L de extracto enzimático para cada uno de los ensayos, además de 1500 μ L de Coomassie G-250 (reactivo de Bradford) Protein Assay Reagent, directamente en una cubeta para lectura espectrofotométrica UV-VIS, la cual se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC - GENESYS 10 UV-VIS.

Figura 14. Medición de POD por método de Bradford



Fuente: esta investigación

Curva de calibración de proteína.

Para la cuantificación de la proteína por el método de Bradford se realizó una curva de calibración utilizando diluciones de estándar de proteína de albumina sérica bovina (BSA) de una concentración de 2000 a 0 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro8) de acuerdo a lo especificado por el manual del kit para ensayos de proteína de ThermoScientific (2010).

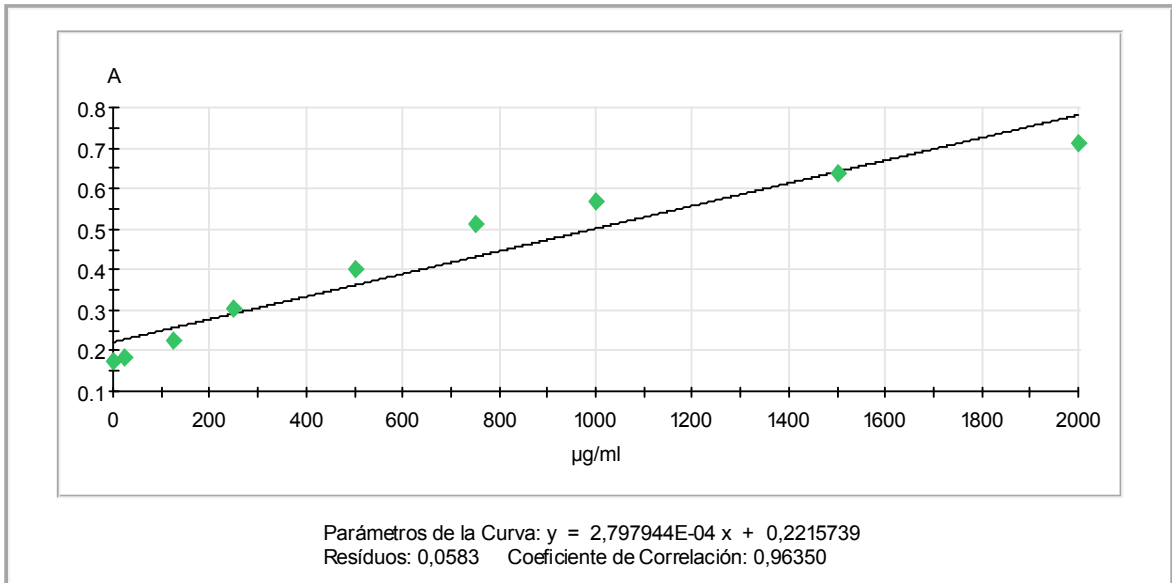
Cuadro8. Diluciones de BSA de 0 – 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Concentración $\mu\text{g/mL}$
0
25
125
250
500
750
1000
1500
2000

Fuente: ThermoScientific (2010)

Las absorbancias se graficaron con su correspondiente concentración de proteína obteniendo así la curva patrón, de una concentración de proteína de 0 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Grafica 3)

Grafica 3. Curva patrón de BSA de 0 – 2000 µg/mL.



Fuente: ésta investigación

Posteriormente se realizó una nueva curva de calibración en un rango más reducido de 800 a 2000 µg/mL, con intervalos de 100 µg/mL, luego de aplicar el protocolo de medición espectrofotométrica se obtuvo la Grafica 4, de la cual se obtuvo la ecuación 5, que representa la regresión lineal de las diferentes concentraciones del estándar de proteína con sus respectivas absorbancias y además presenta una correlación del 98,2 % lo que indica una buen ajuste para poder realizar un excelente cálculo de la proteína.

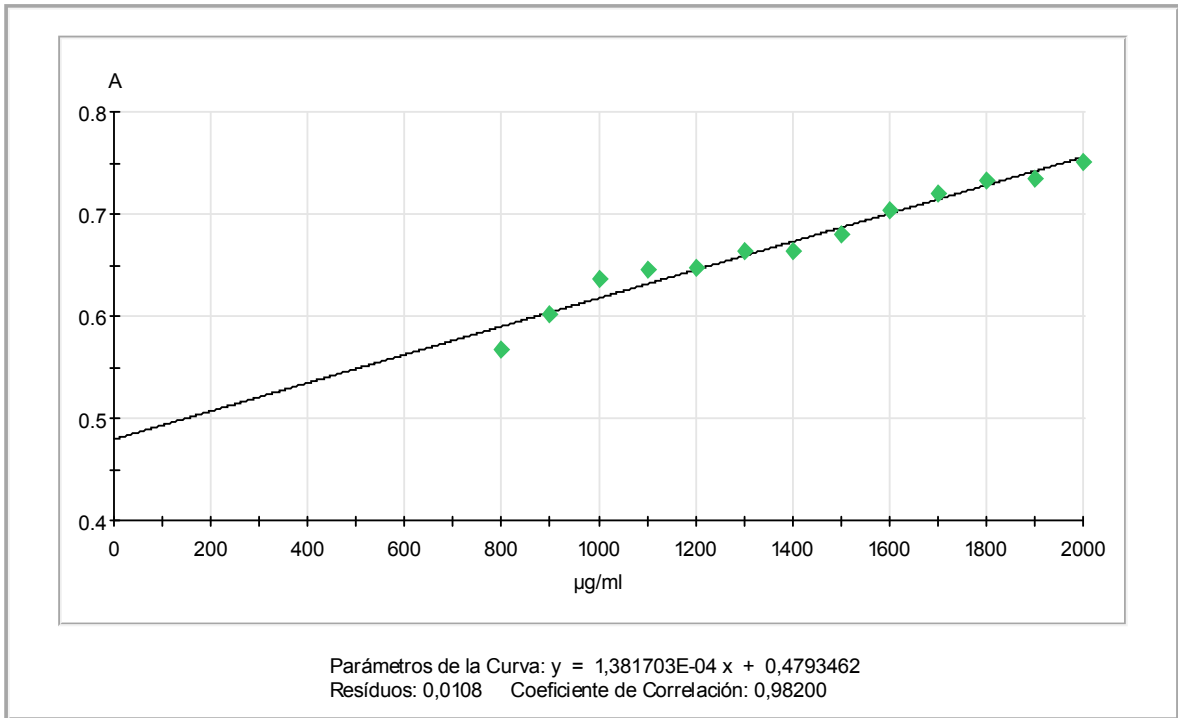
$$Y=1,38170E-4x + 0,4793462 \quad \text{Ecuación 4.}$$

Dónde:

Y=absorbancia

X=concentración de proteína en ug/mL

Grafica 4. Curva patrón de BSA de 800 – 2000 µg/mL.



Fuente: esta investigación

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. TRATAMIENTO POR AIRE CALIENTE.

En el Cuadro 9 se muestran los datos correspondientes a los tratamientos de acuerdo al diseño estadístico de actividad de la enzima residual de POD calculado a partir de la ecuación 1 y expresado en porcentaje, proteína en $\mu\text{g/mL}$ calculado con la ecuación 5, Clorofila a en mg/g calculado con la ecuación 3 y Clorofila b en mg/g calculado con la ecuación 4.

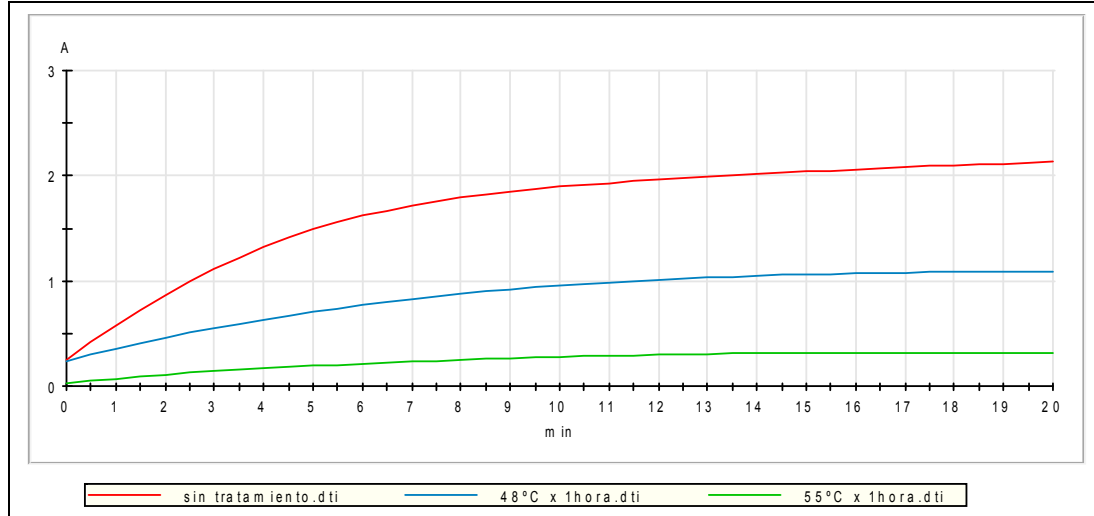
Cuadro 9. Resultados del diseño experimental

Temperatura	Tiempo	%AER	Clorofila a mg/g	Clorofila b mg/g	Proteína $\mu\text{g/ml}$
Sin tratamiento		100	2,18637	1,20351	1725,796
47	2	18,16	1,81129	0,85539	1587,079
48	1	18,43	1,80411	0,84519	1571,156
48	3	12,56	1,74039	0,63871	1556,440
52	0,6	19,45	1,73317	0,63473	1547,031
52	2	14,11	1,73218	0,63237	1536,417
52	2	14,61	1,73122	0,63039	1518,564
52	2	12,85	1,73008	0,62894	1499,747
52	2	13,58	1,70082	0,60195	1479,964
52	3,4	13,37	1,61212	0,47327	1443,536
55	1	17,66	1,56261	0,33632	702,180
55	3	11,04	1,54950	0,15743	690,842
56	2	13,64	1,53810	0,14740	670,336

Fuente: esta investigación

6.1.1. Determinación de la actividad de la enzima residual de POD. En la gráfica 5 se observa la cinética enzimática de la POD que representa la actividad residual de la enzima después de los tratamientos térmicos a 48 y 55 °C por 1 hora con respecto a la actividad de la enzima sin tratamiento.

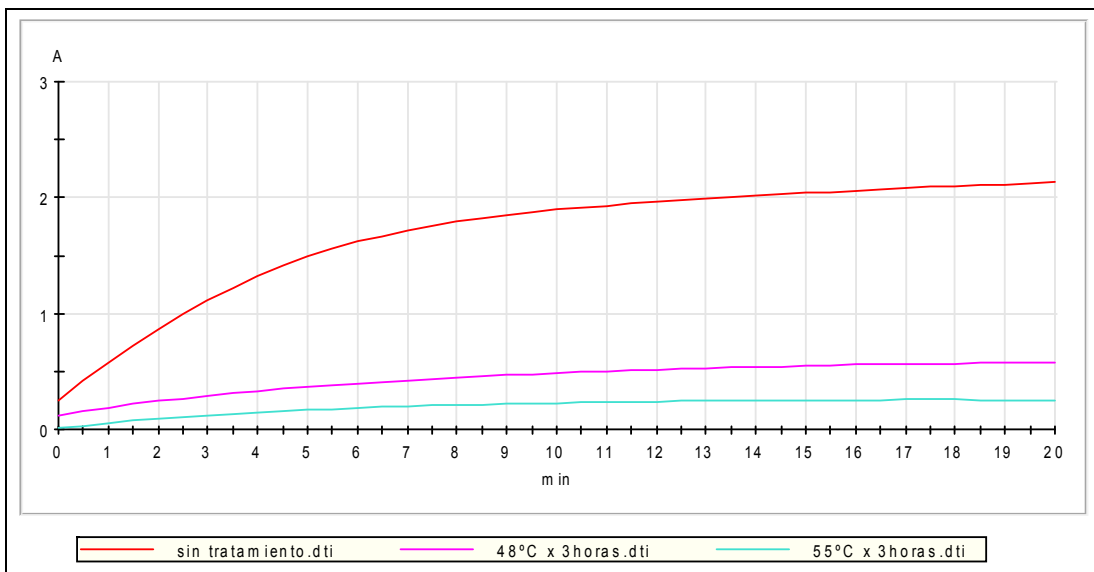
Grafica 5. Cinética enzimática de POD a 48 y 55°C por 1 hora



Fuente: esta investigación

En la Grafica 6 se observa la cinética enzimática de la POD que representa la actividad residual de la enzima después de los tratamientos térmicos a 48 y 55 °C por 3 horas con respecto a la actividad de la enzima sin tratamiento.

Grafica 6. Cinética enzimática de POD a 48 y 55°C por 3 horas



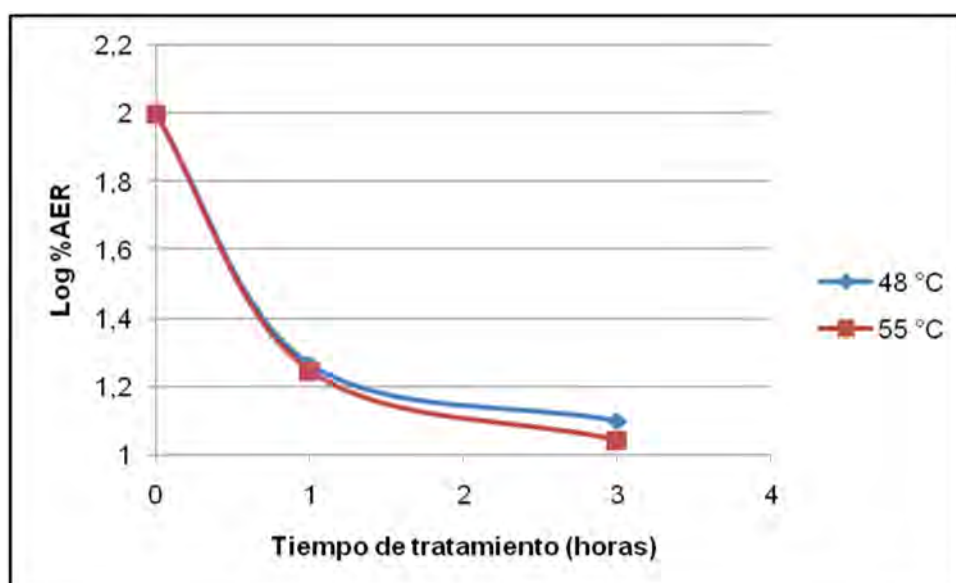
Fuente: esta investigación

Las Graficas 5 y 6 muestran las cinéticas enzimáticas a los diferentes tiempos y temperaturas establecidas en la matriz de diseño estadístico (Cuadro 6)

El Cuadro 9 muestra el porcentaje de actividad de la enzima residual de POD, para cada combinación de temperatura y tiempo, los datos obtenidos fueron analizados con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS centurión XV.

La Gráfica 7 es la representación gráfica de la actividad de la enzima residual Vs tiempo de tratamiento para cada temperatura, donde se observa con gran claridad la reducción de la actividad enzimática ya que se encuentra expresado en forma de logaritmo. La POD muestra una reducción considerable con la aplicación de tratamientos térmicos aproximadamente hasta un 18 % de AER aplicando una temperatura de 48°C por 1 hora y un 11 % de AER utilizando una temperatura de 55°C por 3 horas.

Gráfica 7. Log %AER a 48 y 55°C por 1 y 3 horas



Fuente: esta investigación

Cuadro 10. Análisis de varianza para % AER

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	28,2806	1	28,2806	12,88	0,0013
B: Tiempo	166,919	1	166,919	76,00	0,0000
AA	10,7518	1	10,7518	4,90	0,0352
AB	0,421875	1	0,421875	0,19	0,6645
BB	19,36	1	19,36	8,82	0,0061
bloques	0,52655	2	0,263275	0,12	0,8875
Error total	61,4939	28	2,19621		
Total (corr.)	282,998	35			

R-cuadrada = 78,2706 por ciento

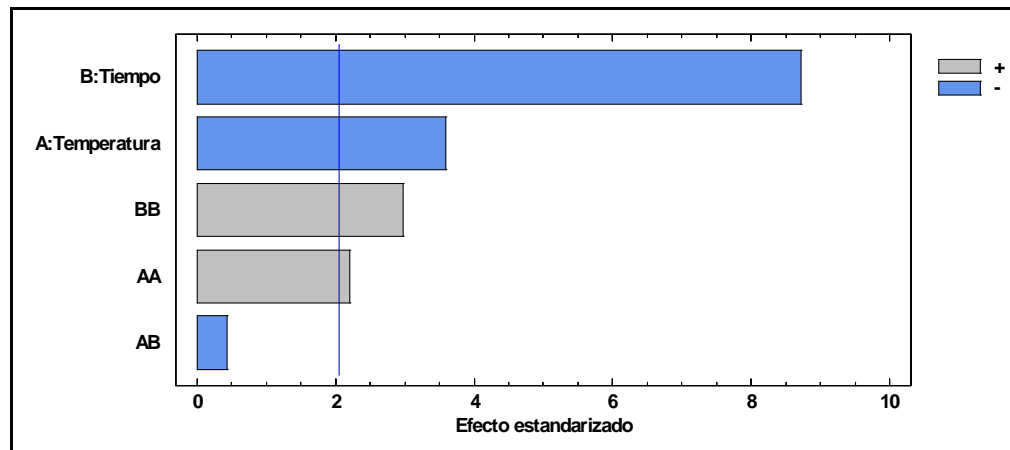
Estadístico Durbin-Watson = 2,19754 (P=0,6125)

El Cuadro 10 muestra la variabilidad de % Actividad Residual en partes separadas para cada uno de los efectos, se indica que 4 efectos tienen un valor-P menor que 0,05 Temperatura (A), Tiempo (B), la interacción entre Temperatura-Temperatura (AA) y Tiempo-Tiempo(BB), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-cuadrado indica un 78,2706% de la variabilidad en %AER, lo que indica una confiabilidad aceptable. El estadístico de Durbin-Watson muestra que los datos no presentan autocorrelación serial en los residuos, puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, con un nivel de significancia del 5,0%.

El Diagrama 1 indica los estimados en orden decreciente de los efectos Temperatura (A), Tiempo (B), presentan un comportamiento inversamente significativo con respecto al %AER; la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y Tiempo-Tiempo(BB), también son factores significativos sobre la actividad enzimática con un efecto directamente proporcional, los efectos que causa la interacción Temperatura-Tiempo (AB), no son representativos sobre la actividad enzimática.

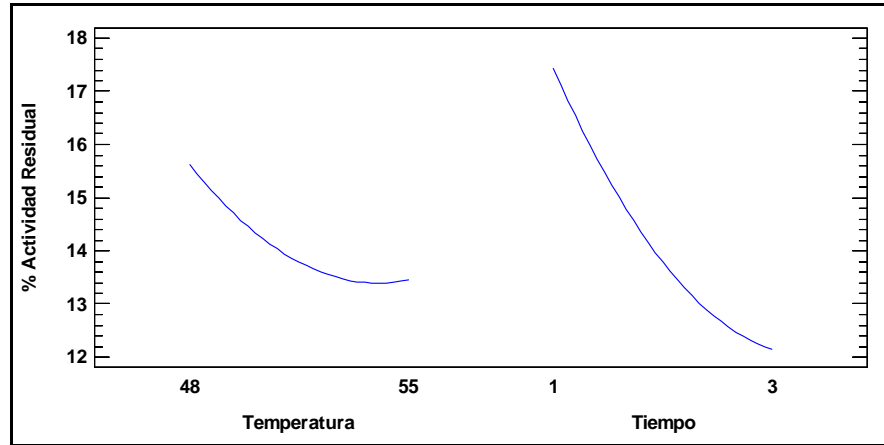
Diagrama 1. Pareto estandarizado para actividad residual.



Fuente: esta investigación

En la Gráfica 8 se observa que los factores temperatura y tiempo son los responsables de la reducción de la enzima, se puede observar que el factor tiempo es el más representativo en la reducción de la enzima hasta un 11 % en 3 horas. Esos valores son expresados por el porcentaje de actividad de la enzima residual (%AER)

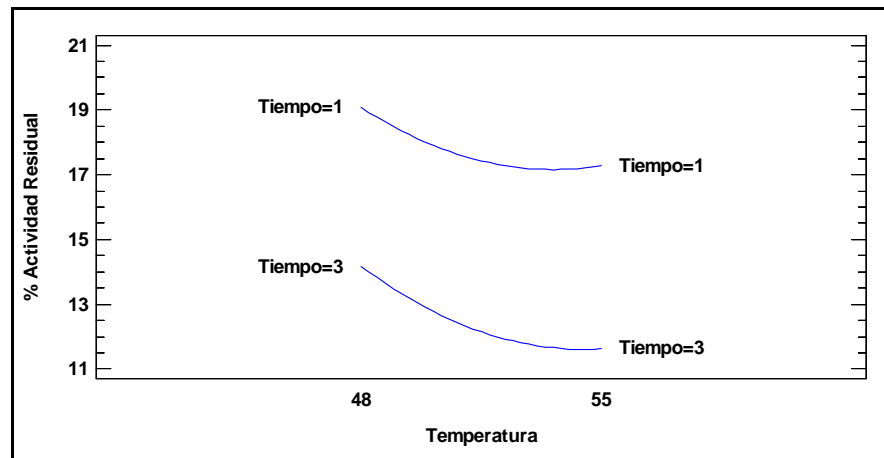
Grafica 8. Efectos principales para % AER.



Fuente: esta investigación

En la Grafica 9, se observan dos curvas que representan los tiempos, 1 y 3 horas; estas indican la diferencia entre los tiempos aplicados respecto al porcentaje de actividad de la enzima residual. Se observa la menor actividad en un tiempo de 3 horas a una temperatura de 55°C.

Grafica 9. Interacción para % AER.

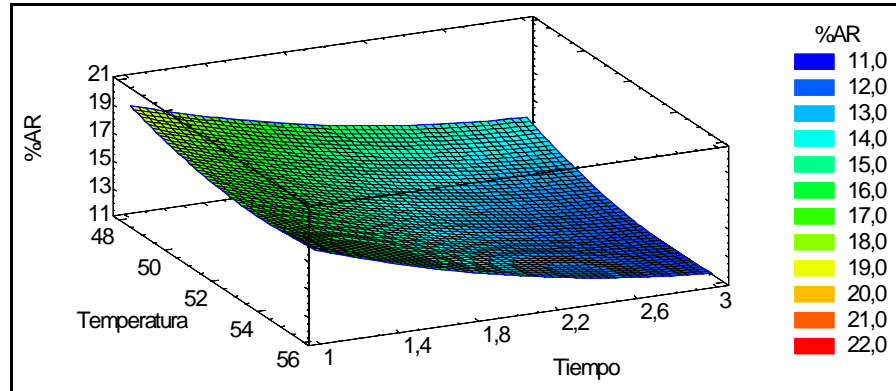


Fuente: esta investigación

La Grafica 10 muestra la superficie de respuesta entre los factores estudiados tiempo y temperatura y el factor respuesta %AER, donde se observa una actividad de la enzima residual de POD del 11,037 % a una temperatura de 55°C por 3 horas, indicando que el factor con más impacto sobre la disminución de POD es el tiempo de exposición. También se observa que la combinación de los factores

tiempo y temperatura es directamente proporcional y esta combinación a su vez es inversamente proporcional con su efecto sobre %AER.

Grafica 10. Superficie de respuesta para actividad residual de POD



Fuente: esta investigación

Optimización de la Respuesta

Para optimizar la respuesta se establece un valor de 10 %AER, los datos analizados muestran un valor óptimo de 11,6105 % AER con una combinación de factores estadísticamente confiables indicados en el Cuadro 11

Cuadro 11. Factores establecidos y óptimos

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	48,0	55,0	54,4771
Tiempo	1,0	3,0	3,0

Fuente: esta investigación

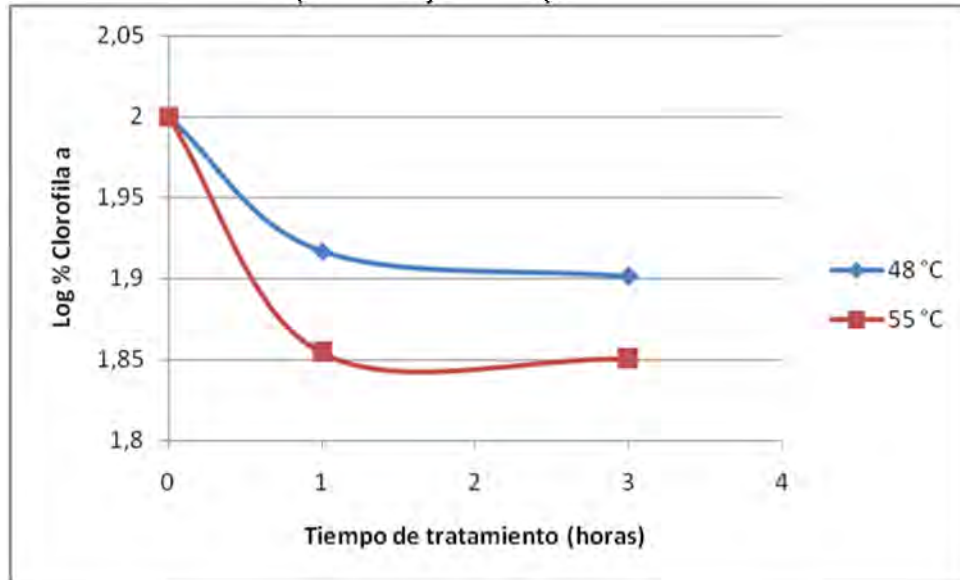
El Cuadro 11 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual mantiene %AER en 10,0 aproximado con valores de los factores de 54°C y 3 horas.

6.1.2. Cuantificación de clorofilas

Clorofila a

La grafica 11, indica que las clorofilas por acción de la temperatura se han degradado transformado en feofitinas así como lo indican Bermudez *et al.*, (1995), Rodés G. *et al.*, (2006) y Yoshio *et al.*, (2003) este efecto es de una manera directamente proporcional, se observa el mismo efecto con el tiempo de exposición.

Grafica 11. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila a



Fuente: esta investigación

Cuadro12. Análisis de Varianza para Clorofila a

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,251367	1	0,251367	612,94	0,0000
B:Tiempo	0,0230698	1	0,0230698	56,25	0,0000
AA	0,0138106	1	0,0138106	33,68	0,0000
AB	0,00192154	1	0,00192154	4,69	0,0391
BB	0,0148861	1	0,0148861	36,30	0,0000
bloques	0,000317341	2	0,00015867	0,39	0,6827
Error total	0,0114829	28	0,000410102		
Total (corr.)	0,312076	35			

R-cuadrada = 96,3205 porciento

Estadístico Durbin-Watson = 1,52884 (P=0,0452)

En elCuadro12de análisis de varianza para Clorofila a, se observa la variabilidad de Clorofila a en partes separadas para cada uno de los efectos, se prueba la significancia estadística de la Temperatura (A), Tiempo (B), la interacción Temperatura-Temperatura (AA), Temperatura-Tiempo (AB) y Tiempo-Tiempo (BB) factores que presentan un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El modelo estadístico R-cuadrado explica que el 96,3205% de la variabilidad en Clorofila a. Con lo que se puede deducir que el diseño cuenta con un buen ajuste, permitiendo hacer un análisis confiable sobre la variable implicada.

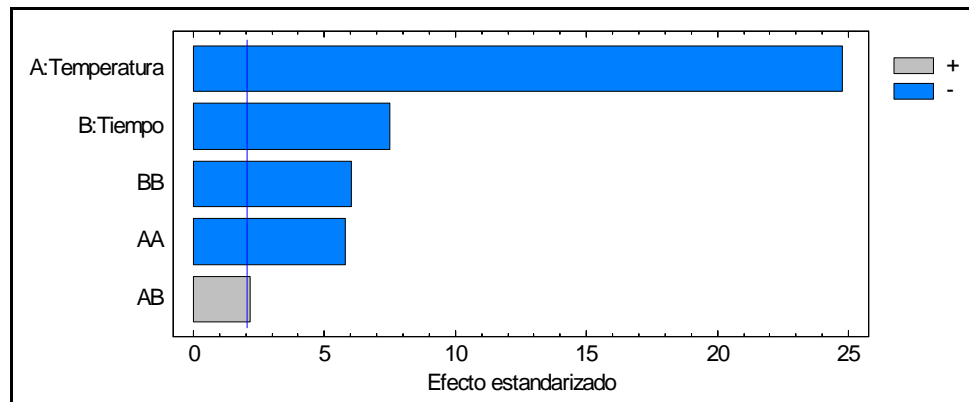
El estadístico de Durbin-Watson con un valor-P menor que 5,0%, indica una posible correlación serial a un nivel de significancia del 5,0%.

El

Diagrama 2 indica los estimados del Cuadro 9 graficados en barras en orden decreciente, de acuerdo al grado de significancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado. Mientras que la línea transversal en un p-valor de 0,05 muestra que todas las barras que se extienden a la derecha presentan efectos estadísticamente significativos a un nivel de significancia del 95%.

El diagrama muestra que los factores y sus interacciones ejercen efecto significativo sobre la degradación de clorofila a con mayor significancia el factor temperatura y que con un nivel de confianza del 95%, indica que la Temperatura (A), el Tiempo (B), la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y la interacción Tiempo-Tiempo (BB) ejercen un efecto inversamente proporcional sobre cantidad de clorofila a, mientras que la interacción entre los dos factores Temperatura-Tiempo (AB) ejerce un efecto directamente proporcional sobre cantidad de clorofila a.

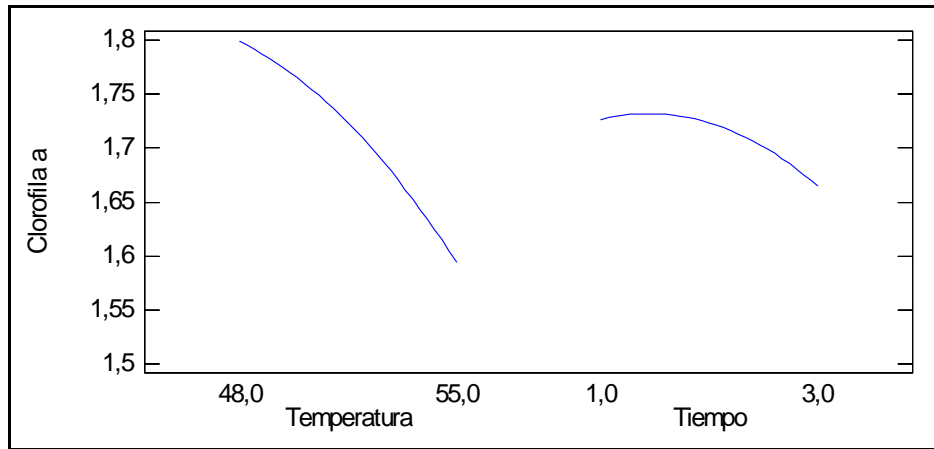
Diagrama 2. Diagrama de Pareto estandarizado para Clorofila a.



Fuente: esta investigación

La Grafica 12 indica que la temperatura es el factor más representativo que afecta de forma inversamente proporcional a los pigmentos fotosintéticos, sin embargo los dos factores tiempo y temperatura representan efectos considerables sobre la clorofila a.

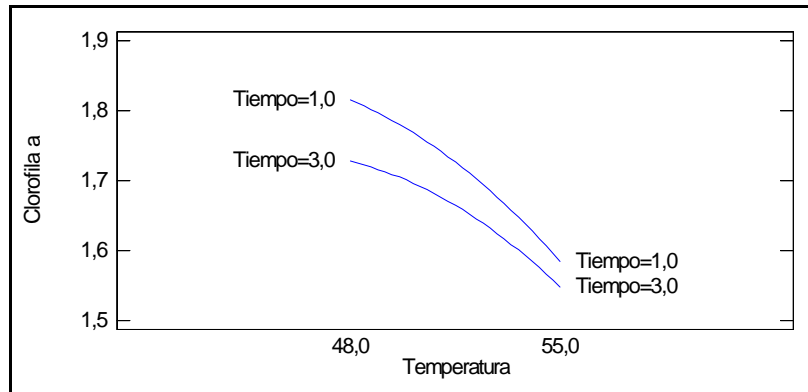
Grafica 12. Efectos Principales para clorofila a.



Fuente: esta investigación

La Grafica 13 muestra que la mayor reducción en la concentración de clorofila a se presentó a un tiempo de 3 horas con una temperatura de 55 °C.

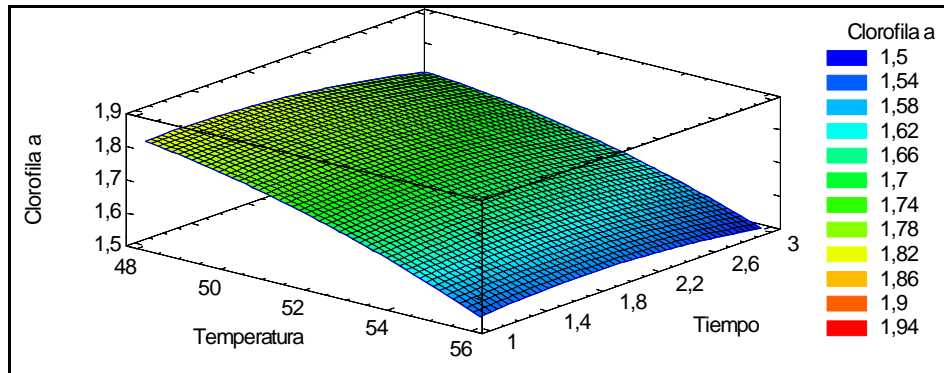
Grafica 13. Interacción para Clorofila a.



Fuente: esta investigación

La grafica 14, muestra la superficie de respuesta de la clorofila a, indicando que a mayor tiempo y temperatura hay un comportamiento inversamente proporcional es decir hay una disminución de clorofila a y por tanto cambios de composición del brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy, también se observa que la temperatura es el factor más representativo sobre la disminución de clorofila a.

Grafica 14. Superficie de respuesta para Clorofila a



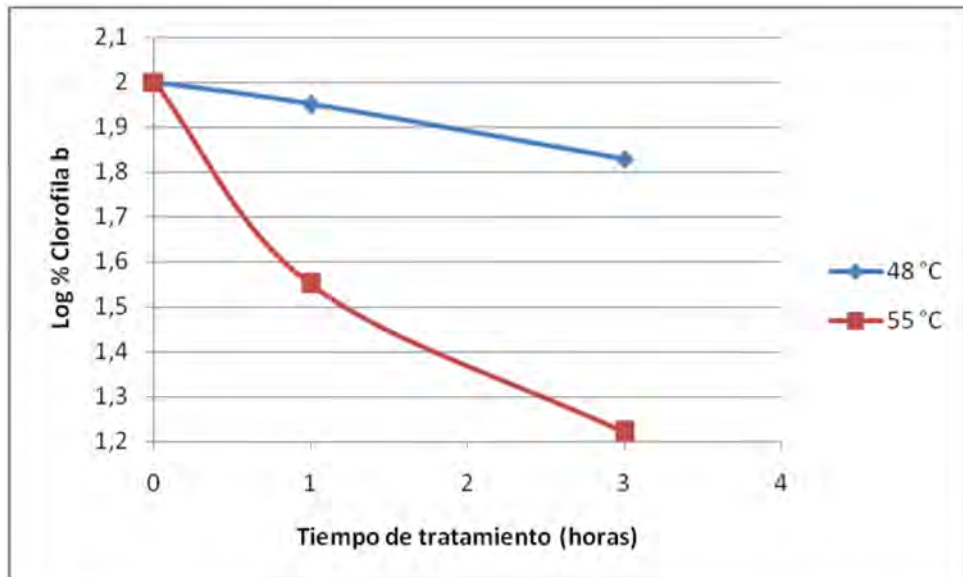
Fuente: esta investigación

Clorofila b

La Grafica 15 muestra que la clorofila b por acción de la temperatura y el tiempo de exposición a esta reduce su concentración este efecto es de una manera inversamente proporcional.

Según Bermudez et al., (1995), Rodés and Collazo, (2006) y Yoshio et al., (2003) la clorofila se degrada transformándose en feofitina.

Grafica 15. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila b



Fuente: esta investigación

Cuadro13. Análisis de Varianza para Clorofila b

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	1,48711	1	1,48711	1904,62	0,0000
B:Tiempo	0,141232	1	0,141232	180,88	0,0000
AA	0,0922896	1	0,0922896	118,20	0,0000
AB	0,000570644	1	0,000570644	0,73	0,3999
BB	0,0355476	1	0,0355476	45,53	0,0000
bloques	0,000261223	2	0,000130611	0,17	0,8468
Error total	0,0218621	28	0,000780791		
Total (corr.)	1,76034	35			

R-cuadrada = 98,7581 por ciento

Estadístico Durbin-Watson = 1,58223 (P=0,0629)

Fuente: esta investigación

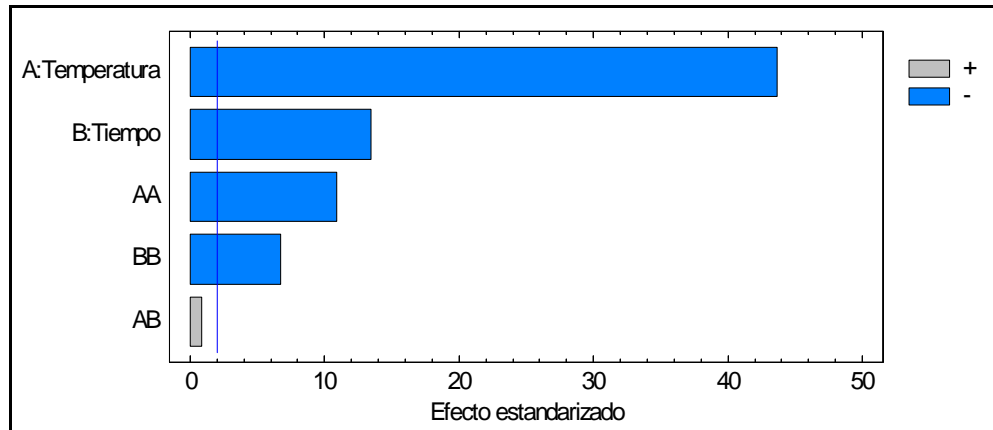
El cuadro 13, muestra la variabilidad de Clorofila b en partes separadas para cada uno de los efectos, prueba la significancia de la Temperatura (A), Tiempo (B), la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y Tiempo-Tiempo (BB) factores que presentan un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrado que el modelo explica un 98,7581% de la variabilidad en Clorofila b. El estadístico de Durbin-Watson con un valor-P mayor que 5,0%, indica que no existe una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%. Garantizando una buena aleatorización.

El diagrama 3, indica los estimados del Cuadro 9 graficados en barras en orden decreciente, además que la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, mientras que la línea transversal en un p-valor de 0,05 muestra que todas las barras que se extienden a la derecha como son Temperatura (A), el Tiempo (B), la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y la interacción Tiempo-Tiempo (BB) presentan efectos estadísticamente significativos sobre la disminución de clorofila b a un nivel de significancia del 95%.

El diagrama 3, también muestra los factores y sus interacciones los cuales muestran un efecto significativo sobre la degradación de clorofila b con mayor significancia el factor temperatura y que con un nivel de confianza del 95%, indica que la Temperatura (A), el Tiempo (B), la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y la interacción Tiempo-Tiempo (BB), ejercen un efecto inversamente proporcional sobre la cantidad de clorofila b.

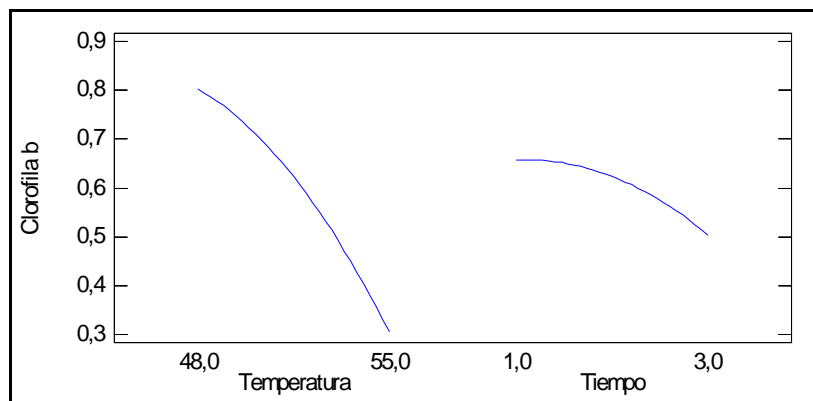
Diagrama 3. Diagrama de Pareto estandarizado para Clorofila b.



Fuente: esta investigación

La grafica 16, muestra que la temperatura es el factor más representativo que afecta inversamente proporcional a la clorofila b, sin embargo los dos factores tiempo y temperatura representan efectos considerables sobre este pigmento fotosintético.

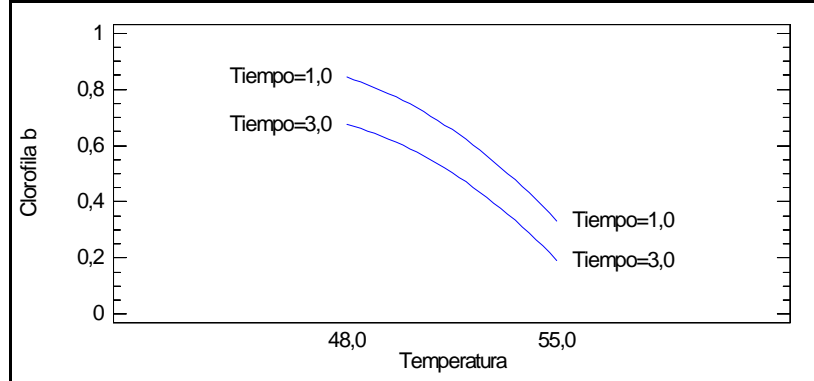
Grafica 16. Efectos Principales para clorofila b



Fuente: esta investigación

La grafica 17, de interacción de los factores tiempo y temperatura muestra dos curvas que representan los tiempos aplicados, en las cuales se observa un efecto sobre la clorofila b inversamente proporcional, siendo este más significativo en un tiempo de 3 horas combinado con una temperatura de 55 °C.

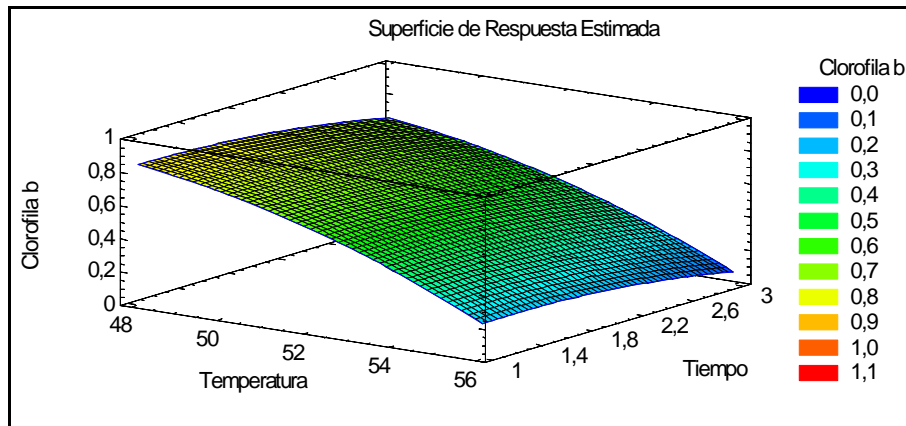
Grafica 17. Interacción para Clorofila b.



Fuente: esta investigación

La Grafica 18 muestra la superficie de respuesta de la clorofila b, con un efecto sobre este pigmento fotosintético inversamente proporcional, además se observa que la temperatura es el factor más representativo sobre la clorofila b.

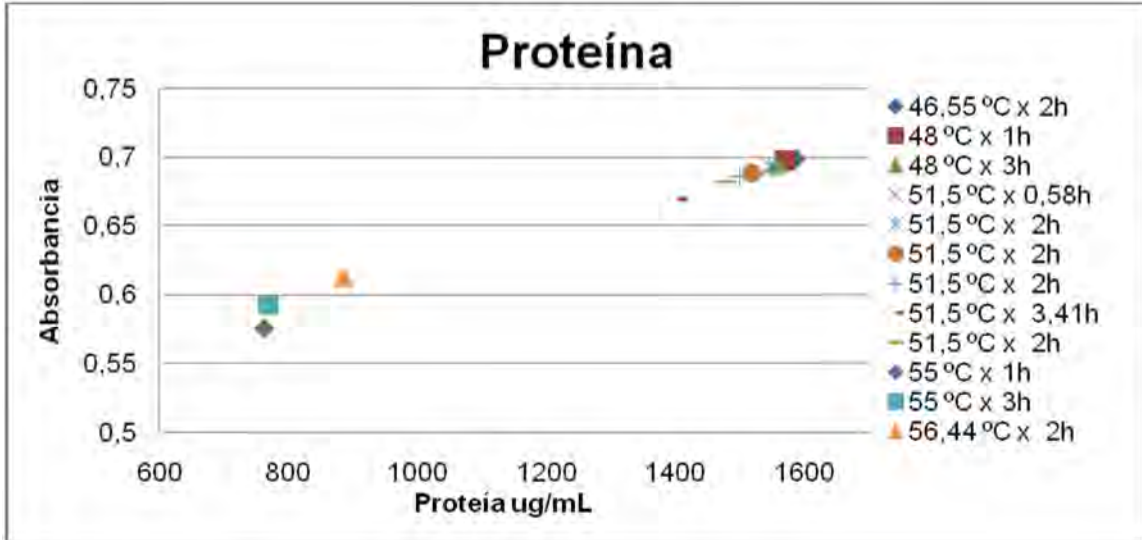
Grafica 18. Superficie de respuesta para Clorofila b



Fuente: esta investigación

6.1.3. Cuantificación de proteína. La Grafica 19 muestra la cantidad de proteína en $\mu\text{g/mL}$ vs la absorbancia presente después de someter al producto a cada una de las combinaciones del tratamiento térmico.

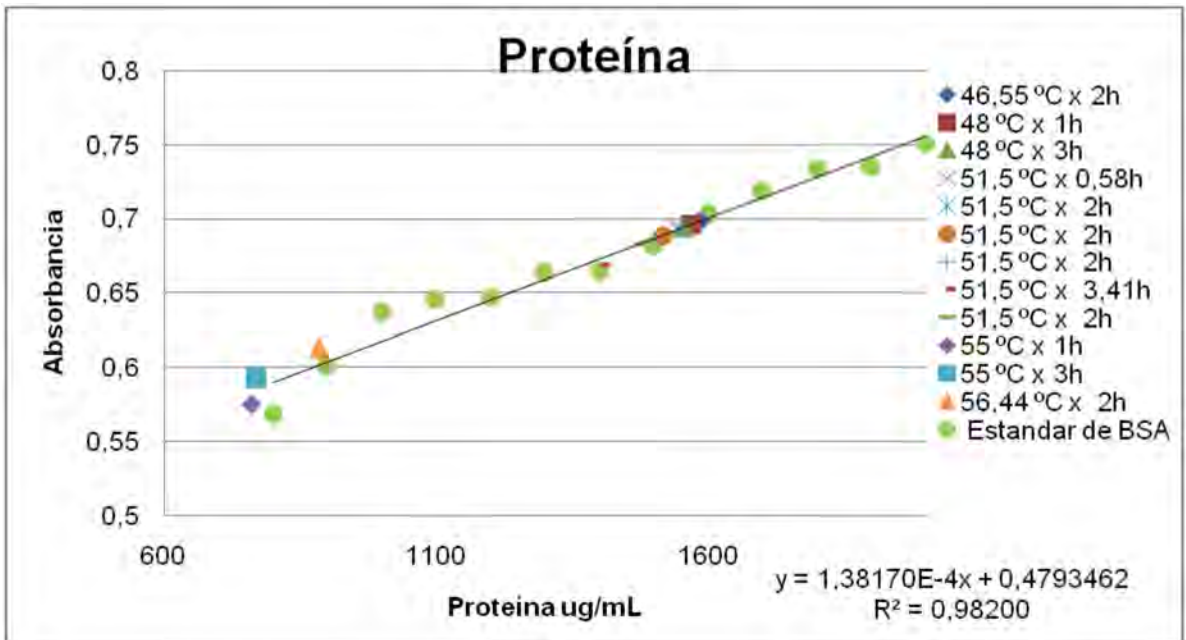
Grafica 19. Concentración de proteína después del tratamiento según diseño estadístico para aire caliente



Fuente: esta investigación

En la Grafica 20 se observa la cantidad de proteína después del tratamiento térmico ubicado en la curva del estándar de proteína BSA que se encuentra en un rango de 800 a 2000 µg/mL.

Grafica 20. Curva de calibración de estándar de BSA de 800 – 2000 µg/ml y Concentración de proteína después del tratamiento con aire caliente.



Fuente: esta investigación

Cuadro14. Análisis de Varianza para Proteína.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	3,44522E6	1	3,44522E6	335,02	0,0000
B:Tiempo	11148,3	1	11148,3	1,08	0,3067
AA	1,06433E6	1	1,06433E6	103,50	0,0000
AB	8,5555	1	8,5555	0,00	0,9772
BB	52224,9	1	52224,9	5,08	0,0322
bloques	2924,5	2	1462,25	0,14	0,8681
Error total	287940,	28	10283,6		
Total (corr.)	4,81208E6	35			

R-cuadrado = 94,0163 % - Estadístico Durbin-Watson = 2,09101 (P=0,4892)

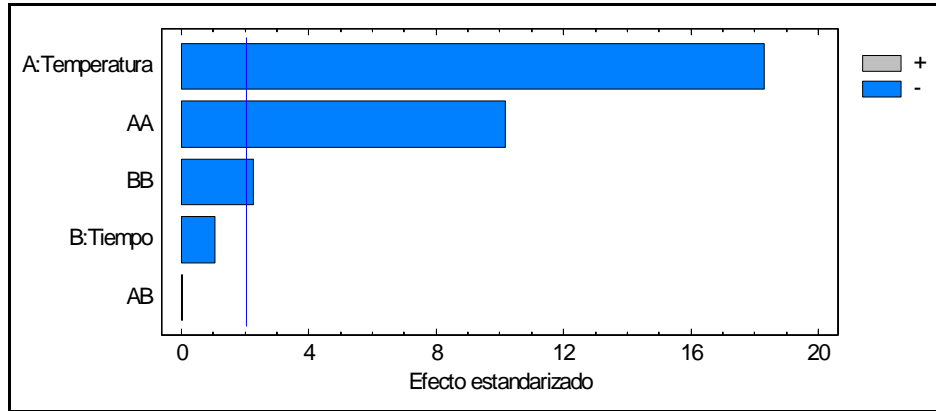
Fuente: esta investigación

El Cuadro14 muestra los efectos, donde la Temperatura (A), la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y la interacción Tiempo-Tiempo (BB) tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrado indica un 94,0163% de la variabilidad en Proteína. El estadístico de Durbin-Watson (DW) muestra que el valor-P es mayor que 5,0%, con lo cual se indica que no hay autocorrelación serial con un nivel de significancia del 5,0%.

El diagrama 4, muestra la significancia de los factores temperatura y tiempo con respecto al comportamiento que presenta la cantidad de proteína frente a estos dos factores (Cuadro9), con un p-valor de 0.05 que indica efectos estadísticamente significativos sobre la disminución de proteína con un nivel de significancia del 95%.

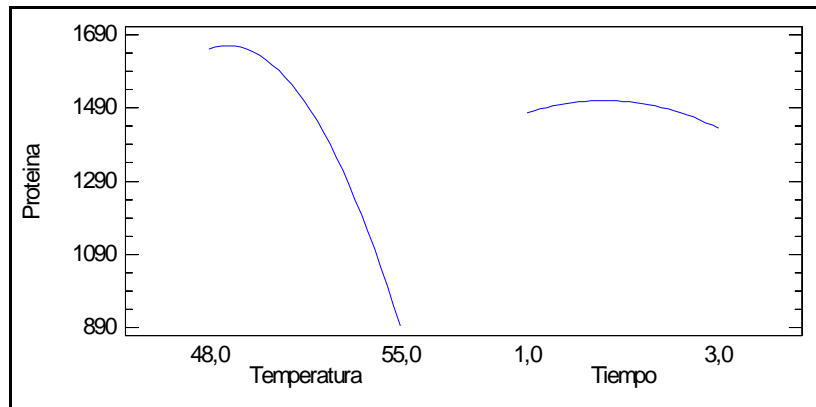
Diagrama 4. Diagrama de Pareto estandarizado para proteína.



Fuente: esta investigación

La Grafica 21 muestra que la temperatura es el factor más representativo que afecta inversamente proporcional a la cantidad de proteína, se observa que el tiempo no es representativo.

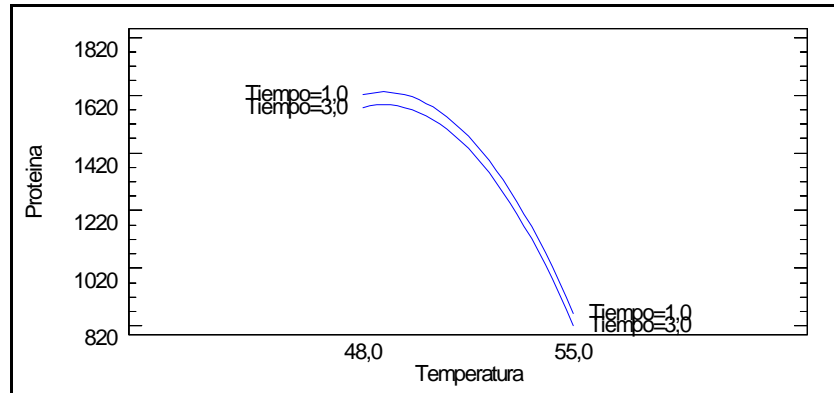
Grafica 21. Efectos Principales para contenido de proteína.



Fuente: esta investigación

La grafica 22, de interacción muestra dos curvas que representan los tiempos aplicados de 1 y 3 horas, en las cuales se observa un efecto sobre la disminución de la proteína, con una variación entre los tiempos no significativa.

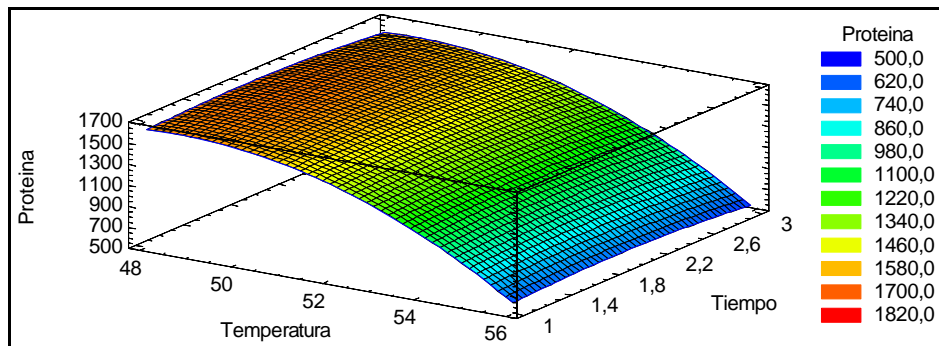
Grafica 22. Interacción para proteína.



Fuente: esta investigación

En la Grafica 23 se muestra la interacción de todas las variables y los comportamientos de estas sobre concentración de proteína, se observa que la temperatura es el factor con mayor efecto inversamente proporcional a la cantidad de proteína, el tiempo no ejerce un efecto significativo.

Grafica 23. Superficie de respuesta para proteína.



Fuente: esta investigación

El desarrollo del diseño estadístico y su análisis arrojó que el mejor tratamiento es a una temperatura de 55 °C por 3 horas que es el que brinda una actividad de la enzima residual de peroxidasa de 11,04% y una cantidad de proteína (POD) de 690,84 µg/ml.

6.1.4. Seguimiento en almacenamiento al ambiente. Al producto tratado con la mejor combinación de factores tanto para tratamiento por aire caliente e inmersión en agua; se realizó un seguimiento en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente durante 8 días, realizando análisis consecutivos día tras día de actividad enzimática, cantidad de proteína y contenido de pigmentos fotosintéticos, los datos promedios obtenidos de 3 replicas se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Seguimiento en almacenamiento.

Días	%AER	Clorofila a mg/g	Clorofila b mg/g	Proteína ug/mL
0	10,915	0,157	0,070	1433,777
1	11,534	0,160	0,071	1439,467
2	12,253	0,163	0,072	1445,583
3	12,975	0,161	0,071	1451,193
4	13,694	0,154	0,069	1479,347
5	15,278	0,153	0,068	1449,313
6	16,132	0,149	0,068	1468,217
7	19,274	0,148	0,066	1480,223
8	23,484	0,142	0,064	1489,693

Fuente: esta investigación

Cuadro 16. Parámetros mínimos permisibles para comercialización de brócoli.

%AR	Clorofila a mg/g	Clorofila b mg/g	Proteína ug/ml
<23,484	>0,142	>0,064	<1489,693

Fuente: esta investigación.

En las gráficas 24, 25, 26 y 27 se observa el comportamiento de los parámetros evaluados durante el almacenamiento, en el día octavo se observa un amarillamiento del producto es decir el limite optimo del brócoli (*Brassica oleracea* L) variedad Legacy, para su comercialización, y según la investigación desarrollada se puede decir que los parámetros mínimos permisibles para la comercialización son los expresados en el Cuadro 16.

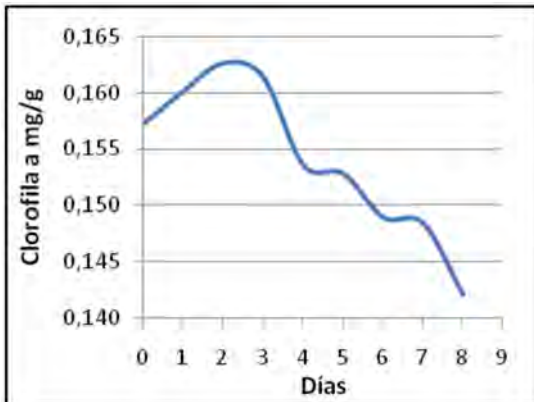
Las gráficas 25 y 26 muestran un aumento en la cantidad de clorofilas a y b los primeros 2 días de almacenamiento, a partir del 3 día presenta una disminución continua de pigmentos fotosintéticos los cuales son degradados y transformados en carotenoides y pigmentos amarillentos y marrones (Yoshio *et al.*, 2003; Rodés G. *et al.*, 2006) estos defectos ocasionados en el brócoli son causados por la reactivación de la enzima POD que se observa en las gráficas 24 y 27.

Grafica 24. Días vs % AER.



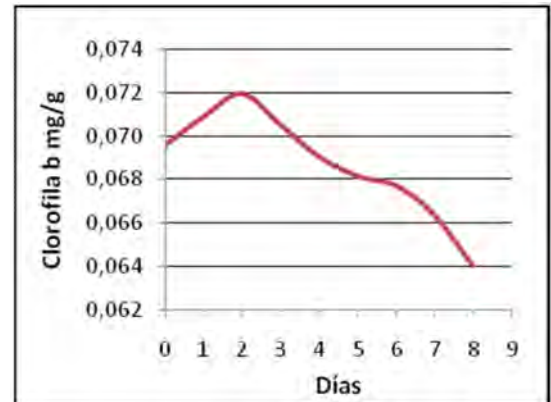
Fuente: esta investigación

Grafica 25. Días vs mg/g de Clorofila a.



Fuente: esta investigación

Grafica 26. Días vs mg/g de Clorofila b



Fuente: esta investigación

Grafica 27. Días vs ug/ml de proteína.



Fuente: esta investigación

Cuadro17. Análisis de la varianza para % AER

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Actividad de la enzima residual	27	1,00	1,00	0,93

Cuadro de Análisis de Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	400,86	8	50,11	2572,39	<0,0001
TIEMPO	400,86	8	50,11	2572,39	<0,0001
Error	0,35	18	0,02		
Total	401,21	26			

Cuadro18. Test:Tukeypara % AER

Alfa=0,05 DMS=0,39929

Error: 0,0195 gl: 18

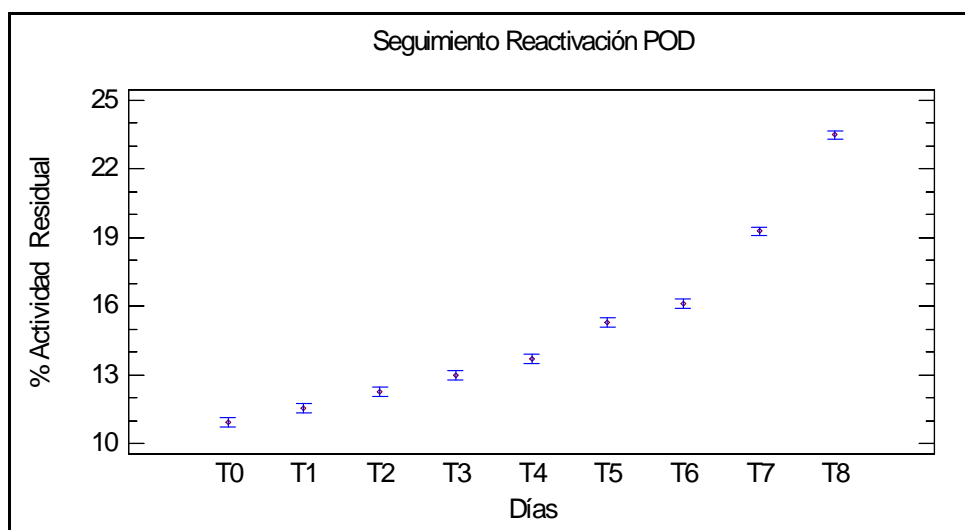
TIEMPO	Medias	n	E. E.	
T0	10,91	3	0,08	A
T1	11,53	3	0,08	B
T2	12,25	3	0,08	C
T3	12,97	3	0,08	D
T4	13,69	3	0,08	E
T5	15,28	3	0,08	F
T6	16,13	3	0,08	G
T7	19,27	3	0,08	H
T8	23,48	3	0,08	I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0,05$)

El análisis de varianza Cuadro17 explica en un 100 % la variabilidad del %AER, lo que permite hacer un análisis confiable sobre %AER. El análisis muestra diferencia altamente significativa entre los días analizados ya que su p-valor es menor de 0,0001.

El test de Tukey(cuadro 18) muestra que las medias marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes, también se muestran en la Grafica 28, con un p-valor $\leq 0,05$, es decir que a medida que aumentan los días se presenta un aumento significativo en la enzima residual expresado en su actividad.

Grafica 28. Grafica de medias para reactivación de POD



Fuente: esta investigación

Cuadro19. Análisis de la Varianza para clorofila a

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila a mg/g	27	0,92	0,88	1,51

Cuadro de Análisis de Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,1E-03	8	1,4E-04	25,83	<0,0001
TIEMPO	1,1E-03	8	1,4E-04	25,83	<0,0001
Error	9,8E-05	18	5,4E-06		
Total	1,2E-03	26			

Cuadro20. Test de Tukey para clorofila a

Alfa=0,05 DMS=0,00668

Error: 0,0000 gl: 18

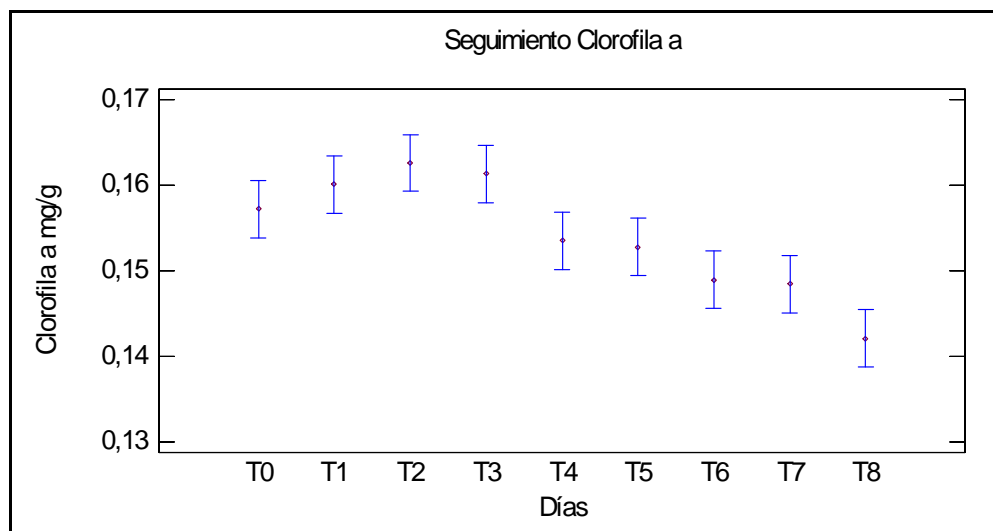
TIEMPO	Medias	n	E.E.						
T8	0,14	3	1,3E-03	A					
T7	0,15	3	1,3E-03	A	B				
T6	0,15	3	1,3E-03		B				
T5	0,15	3	1,3E-03		B	C			
T4	0,15	3	1,3E-03		B	C	D		
T0	0,16	3	1,3E-03			C	D	E	
T1	0,16	3	1,3E-03				D	E	
T3	0,16	3	1,3E-03					E	
T2	0,16	3	1,3E-03					E	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0,05)

El análisis de varianza Cuadro 19 explica en un 92 % la variabilidad en la degradación de clorofila a, el análisis muestra diferencia altamente significativa entre los días analizados ya que su p-valor es menor de 0,0001.

El test de Tukey que se muestra en el Cuadro 20 y la grafica 29, muestran que hasta el día 2 hay un aumento de clorofila a, a partir de este tiempo se presenta una degradación progresiva, el análisis de medias con una letra común muestra que no son significativamente diferentes con un p-valor menor igual a 0,05.

Grafica 29. Grafica de medias para degradación de clorofila a



Fuente: esta investigación

Cuadro 21. Análisis de varianza para clorofila b

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila b mg/g	27	0,89	0,85	1,42

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,4E-04	8	1,8E-05	18,90	<0,0001
TIEMPO	1,4E-04	8	1,8E-05	18,90	<0,0001
Error	1,7E-05	18	9,5E-07		
Total	1,6E-04	26			

Cuadro 22. Test de Tukey para clorofila b

Alfa=0,05 DMS=0,00279

Error: 0,0000 gl: 18

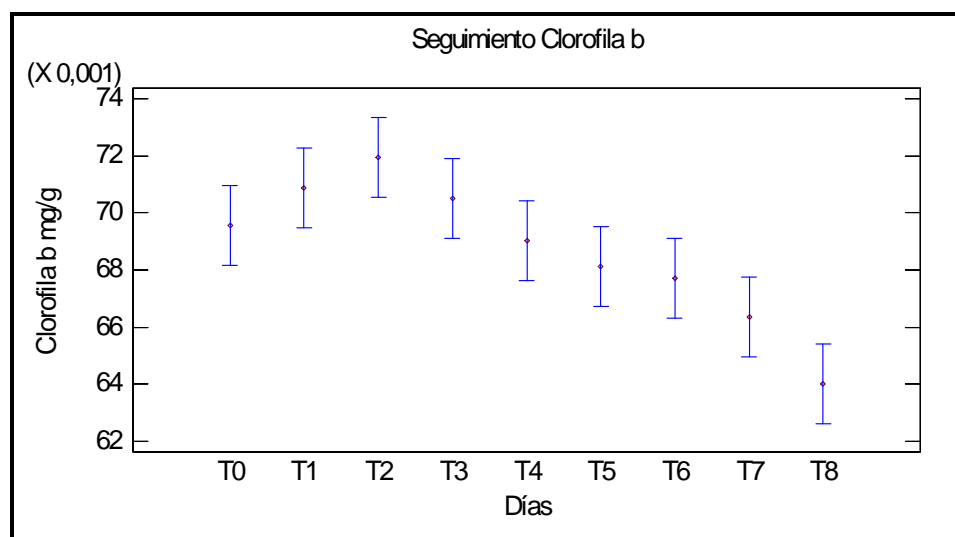
TIEMPO	Medias	n	E.E.						
T8	0,06	3	5,6E-04	A					
T7	0,07	3	5,6E-04	A	B				
T6	0,07	3	5,6E-04		B	C			
T5	0,07	3	5,6E-04		B	C	D		
T4	0,07	3	5,6E-04		B	C	D		
T0	0,07	3	5,6E-04			C	D	E	
T3	0,07	3	5,6E-04				D	E	
T1	0,07	3	5,6E-04				D	E	
T2	0,07	3	5,6E-04					E	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El análisis de varianza Cuadro21 explica en un 89 % la variabilidad en la degradación de clorofila b, el análisis muestra diferencia altamente significativa entre los días analizados ya que su p-valor es menor de 0,0001.

En el test de Tukey que se muestra en el Cuadro 22 se observa un aumento de clorofila b hasta el tiempo 2, a partir de este tiempo se observa un decrecimiento de este pigmento en el transcurso del tiempo, este comportamiento también se observa en la grafica 30. El análisis de medias con una letra común muestra que no son significativamente diferentes con un p-valor menor igual a 0,05.

Grafica 30. Grafica de medias para degradación de clorofila b



Fuente: esta investigación

Cuadro23. Análisis de varianza para cantidad de proteína (POD)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PROTEINA ug/ml	27	1,00	1,00	0,05

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9720,72	8	1215,09	2600,73	<0,0001
TIEMPO	9720,72	8	1215,09	2600,73	<0,0001
Error	8,41	18	0,47		
Total	9729,13	26			

Cuadro24. Test de Tukey para cantidad de proteína (POD)

Alfa=0,05 DMS=1,95550

Error: 0,4672 gl: 18

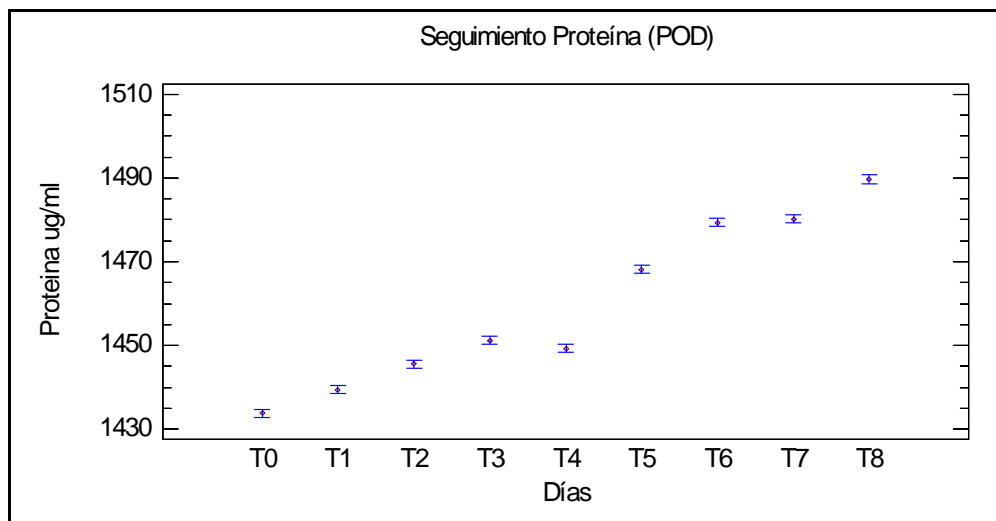
TIEMPO	Medias	n	E. E.	
T0	1433,78	3	0,39	A
T1	1439,47	3	0,39	B
T2	1445,58	3	0,39	C
T4	1449,31	3	0,39	D
T3	1451,19	3	0,39	D
T5	1468,22	3	0,39	E
T6	1479,35	3	0,39	F
T7	1480,22	3	0,39	F
T8	1489,69	3	0,39	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El análisis de varianza (Cuadro 23) explica en un 100 % la variabilidad en la degradación de proteína (POD), también muestra diferencia altamente significativa entre los días analizados con un p-valor es menor de 0,0001.

En el test de Tukey que se muestra en el Cuadro 24 y en la Grafica 31 se observa que a medida que aumenta el tiempo se presenta un aumento progresivo de POD. El análisis de Medias con una letra común muestra que no son significativamente diferentes con un p-valor menor igual a 0,05 y una diferencia mínima significativa de 1,95550.

Grafica 31. Grafica de medias para reactivación de proteína (POD)



Fuente: esta investigación

En las figuras 15, 16, 17, 18, 19 y 20 se observa el estado del brócoli durante almacenamiento desde 0 hasta 8 días.

Figura 15. Brócoli fresco sin tratamiento



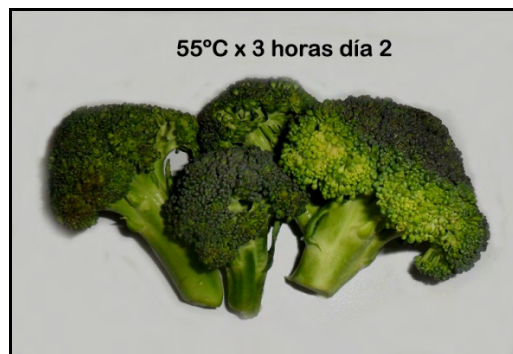
Fuente: esta investigación

Figura 16. Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 0



Fuente: esta investigación

Figura 17. Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 2



Fuente: esta investigación

Figura 18. Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 5



Fuente: esta investigación

Figura 19. Brócoli con tratamiento de 55°C por 3 horas día 8



Fuente: esta investigación

Figura 20. Brócoli sin tratamiento día 8



Fuente: esta investigación

6.2. TRATAMIENTO POR INMERSION EN AGUA

Cuadro25. Actividad residual para inmersión en agua

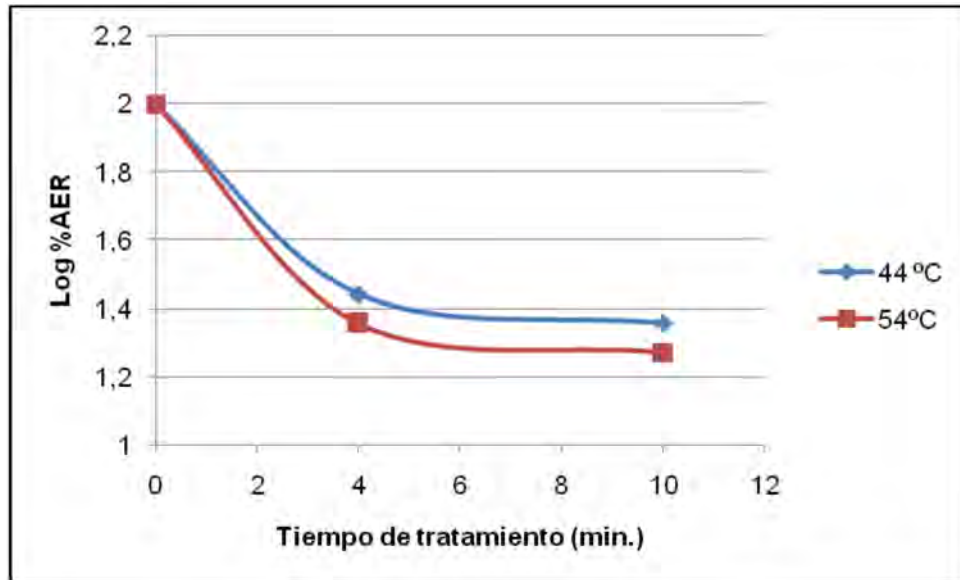
Temperatura	Tiempo	%AER	Clorofila a mg/g	Clorofila b mg/g	Proteína ug/ml
Sin tratamiento		100	2,18637	1,20351	1725,796
42	7	26,90	1,83933	1,08719	1708,909
44	4	27,64	1,77100	1,15415	1510,120
44	10	22,85	1,67457	1,11369	1486,961
49	2,8	29,42	1,58288	1,03336	1296,133
49	7	21,83	1,52583	1,00602	873,949
49	7	21,71	1,46007	0,94210	846,929
49	7	21,73	1,43393	0,86827	827,629
49	7	20,62	1,40554	0,81188	781,792
49	11,2	21,85	1,37882	0,77035	747,776
54	4	22,74	1,34590	0,73104	648,141
54	10	18,72	1,30496	0,71380	619,432
56	7	21,87	1,28902	0,69859	611,230

Fuente: esta investigación

El Cuadro25 muestra los datos promedio de tres repeticiones correspondientes al tratamiento por inmersión en agua de acuerdo al diseño estadístico, valores obtenidos de las ecuaciones 1, 5, 3 y 4 de porcentaje de actividad de la enzima residual de POD, proteína en ug/mL, Clorofila a en mg/g y Clorofila b en mg/g respectivamente.

6.2.1. Determinación de la actividad de la enzima residual de POD. La grafica 32, es la representación gráfica de la actividad de la enzima residual Vs tiempo de tratamiento para cada temperatura, donde se observa con gran claridad la reducción de la actividad enzimática ya que se encuentra expresado en forma de logaritmo. La POD muestra una reducción considerable con la aplicación de tratamientos térmicos aproximadamente hasta un 27 % aplicando una temperatura 44°C por 4 minutos y un 18 % con una temperatura de 54 °C por 10 minutos respecto a la actividad inicial.

Grafica 32. Log %AER a 44 y 54°C por 4 y 10 minutos



Fuente: esta investigación

Cuadro 26. Análisis de Varianza para % Actividad de la enzima residual

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	97,7256	1	97,7256	53,21	0,0000
B: Tiempo	142,699	1	142,699	77,69	0,0000
AA	17,3905	1	17,3905	9,47	0,0046
AB	0,435102	1	0,435102	0,24	0,6302
BB	47,5343	1	47,5343	25,88	0,0000
bloques	2,36084	2	1,18042	0,64	0,5335
Error total	51,427	28	1,83668		
Total (corr.)	350,299	35			

R-cuadrado = 85,3191 por ciento

Estadístico Durbin-Watson = 1,66232 (P=0,0955)

Fuente: esta investigación

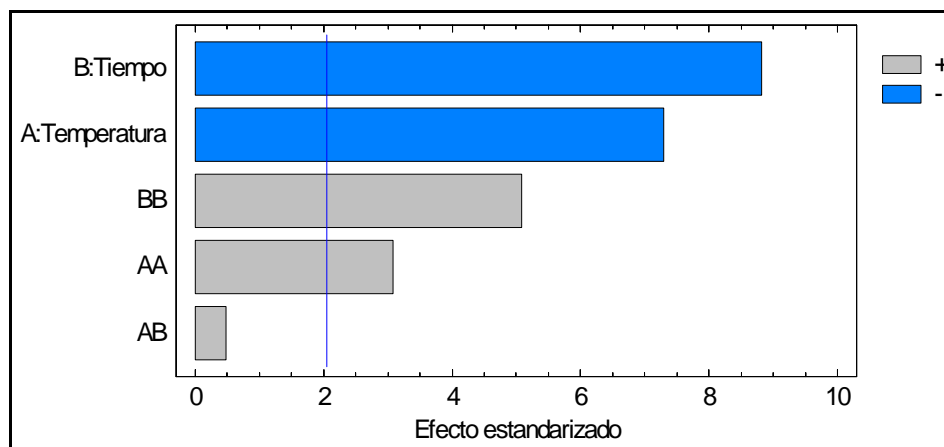
En el análisis de varianza se observa la variabilidad del % Actividad de la enzima residual en partes separadas para cada uno de los efectos, así como la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 4 efectos Temperatura (A), Tiempo (B), la interacción entre Temperatura-Tiempo (AB) y Tiempo-Tiempo (BB) tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica 85,3191% de la variabilidad en actividad de la enzima residual. Con lo que se puede deducir que el diseño cuenta con un ajuste aceptable, permitiendo hacer un análisis confiable sobre las variables implicadas.

Con el test estadístico de Durbin-Watson se prueba los residuos para determinar si hay correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos. Debido a que el valor-P es 0,0019, menor que 0,05 se observa una correlación serial a un nivel de significancia del 5,0%. Garantizando una buena aleatorización de los experimentos.

El diagrama de Pareto estandarizada para % actividad de la enzima residual (Diagrama 5) muestra los dos factores tiempo y temperatura los cuales tienen efecto representativo inversamente proporcional sobre la actividad de la enzima residual, con mayor significancia el factor tiempo, la interacción tiempo-tiempo muestra una significancia media.

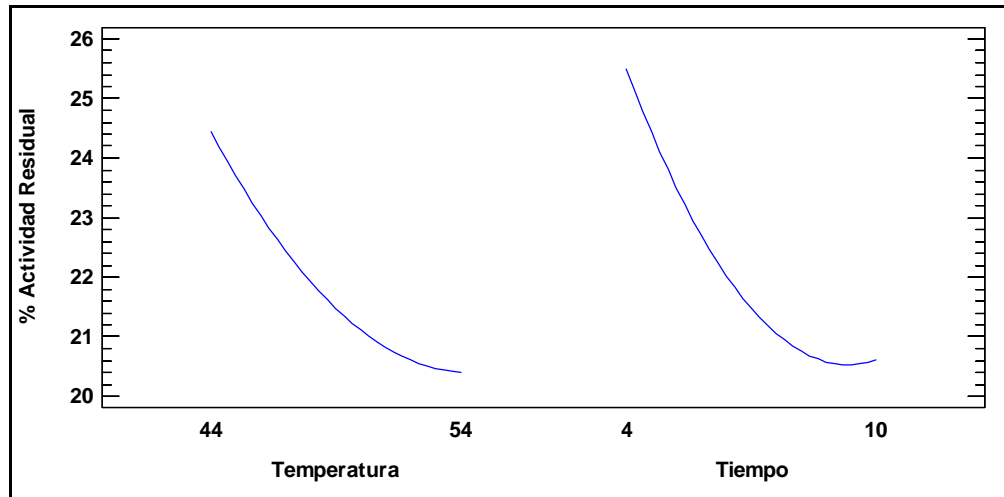
Diagrama 5. Diagrama de Pareto estandarizada para % Actividad de la enzima residual



Fuente: esta investigación

La Grafica 33 muestra una actividad residual más baja a una temperatura de 54 °C y un tiempo de 10 minutos de exposición. También se observa que el factor representativo en la disminución de la actividad de la enzima residual de POD es el tiempo de exposición al tratamiento térmico por inmersión en agua, observado en una mayor pendiente.

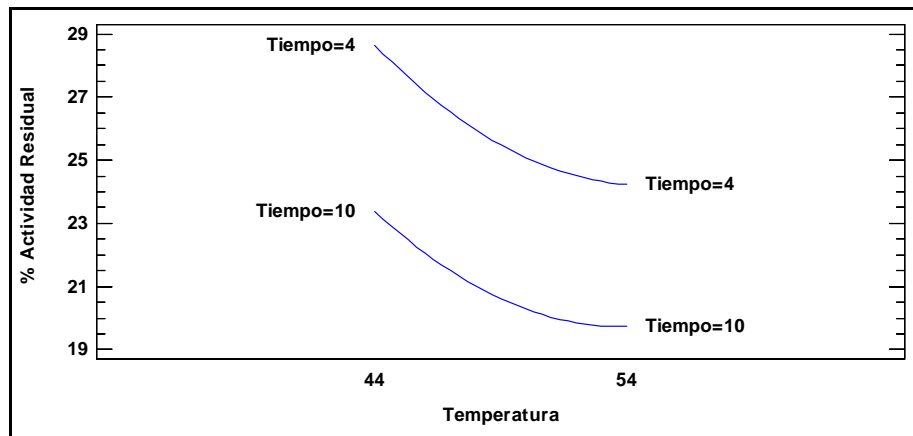
Grafica 33.Efectos principales para % AER



Fuente: esta investigación

La Grafica 34 muestra que la mayor disminución de POD se presentó a un tiempo de 10 minutos y una temperatura de 54°C.

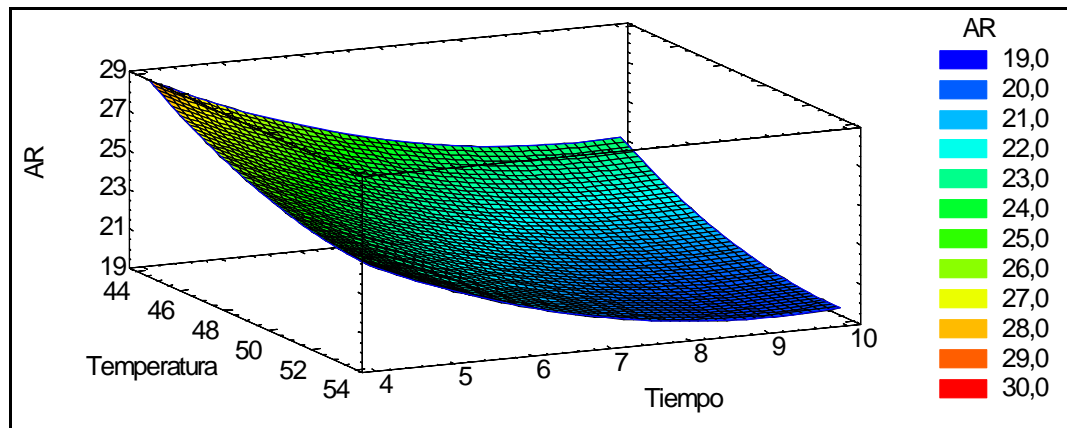
Grafica 34.Interacción para % Actividad de la enzima residual.



Fuente: esta investigación

La Grafica 35 muestra la superficie de respuesta entre los factores estudiados (tiempo y temperatura) y el % AER, donde se observa una actividad residual de POD del 18 % a una temperatura de 54°C por 10 minutos, indicando que el factor con más impacto en el tratamiento por inmersión en agua es el tiempo de exposición.

Grafica 35. Superficie de respuesta estimada para % Actividad de la enzima residual.



Fuente esta investigación

Optimización de la respuesta

Para optimizar la respuesta se establece un valor de 10 %AER, los datos analizados muestran un valor óptimo de 19,606 % AER con una combinación de factores estadísticamente confiables indicados en el Cuadro 27.

Cuadro 27. Factores establecidos y óptimos

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	44,0	54,0	53,9425
Tiempo	4,0	10,0	9,14507

Fuente: esta investigación

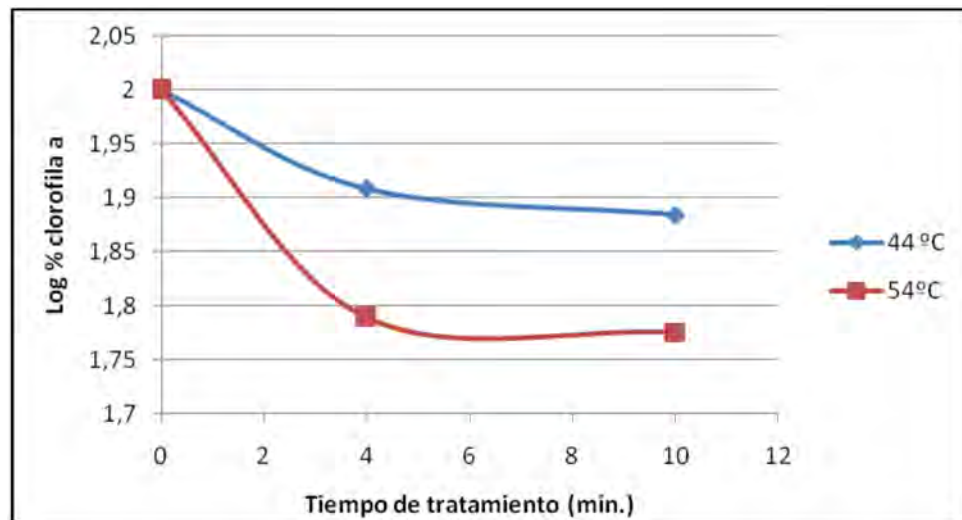
Cuadro 27 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual mantiene %AER en 10,0 aproximado con valores de los factores de 54,94 °C y 9,14 minutos.

6.2.2. Cuantificación de clorofilas

Clorofila a

Grafica 36. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila a muestra que la clorofila a por acción de la temperatura y el tiempo de exposición a esta reduce su concentración este efecto es de una manera inversamente proporcional.

Grafica 36. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila a



Fuente: esta investigación

Cuadro28. Análisis de Varianza para Clorofila a

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,92785	1	0,92785	456,31	0,0000
B:Tiempo	0,0680463	1	0,0680463	33,46	0,0000
AA	0,0566446	1	0,0566446	27,86	0,0000
AB	0,00230927	1	0,00230927	1,14	0,2957
BB	0,00307362	1	0,00307362	1,51	0,2291
bloques	0,00423858	2	0,00211929	1,04	0,3659
Error total	0,0569344	28	0,00203337		
Total (corr.)	1,11609	35			

R-cuadrado = 94,8988 porciento

Estadístico Durbin-Watson = 2,42035 (P=0,8125)

El Cuadro28 muestra la variabilidad de Clorofila a en partes separadas de cada efecto en este caso, la temperatura, el tiempo y la interacción temperatura-

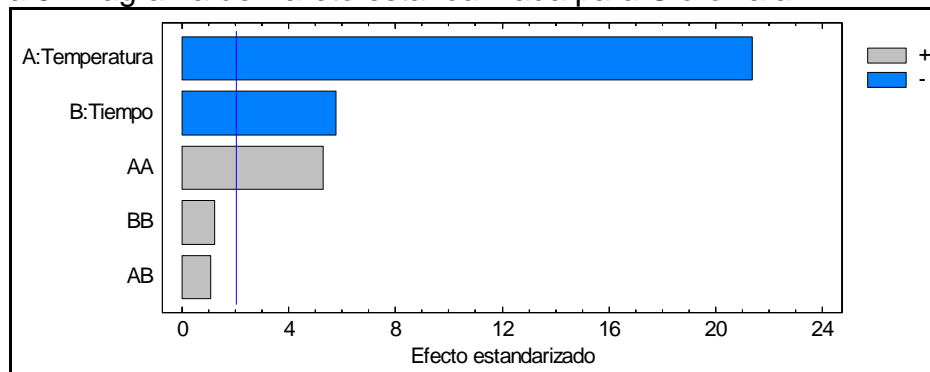
temperatura tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-cuadrado indica un 94,8988% de la variabilidad en Clorofila a. El estadístico de Durbin-Watson con un valor-P mayor que 5,0%, indica que no hay autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

El Diagrama 6 muestra los estimados del Cuadro 25 en barras en orden decreciente de acuerdo a la significancia para cada efecto Temperatura (A), Tiempo (B) y la interacción Temperatura-Tiempo (AA) son significativos en la cantidad de clorofila a, a un nivel de confianza del 95%. Mientras que los efectos de la interacción Tiempo-Tiempo (BB) y Temperatura-Tiempo (AB) no presentan un significancia.

La temperatura ejerce un efecto inversamente proporcional es decir que la temperatura causa una disminución considerable en la cantidad de clorofila a.

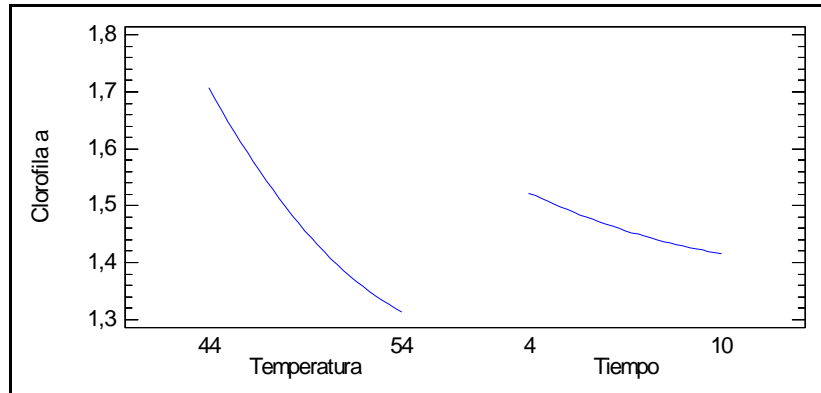
Diagrama 6. Diagrama de Pareto estandarizada para Clorofila a.



Fuente: esta investigación

La grafica 37, de efectos principales para clorofila a indica que la temperatura es el factor que causa más efecto sobre la disminución de clorofila a, se observa una mayor disminución a una temperatura de 54 °C en un tiempo de 10 minutos.

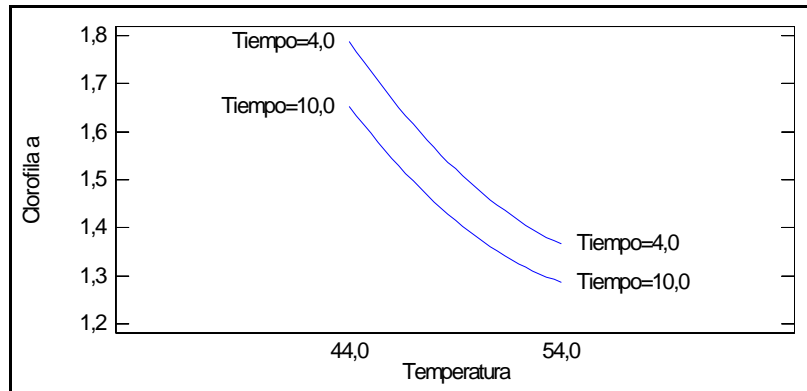
Grafica 37. Efectos principales para Clorofila a



Fuente: esta investigación

En la Grafica 38 se observan dos curvas que representan los tiempos; una el tiempo 4 minutos y la otra de 10 minutos. Donde se observa que el tiempo de 10 minutos es el factor que causa más efecto sobre la disminución de la cantidad de clorofila a.

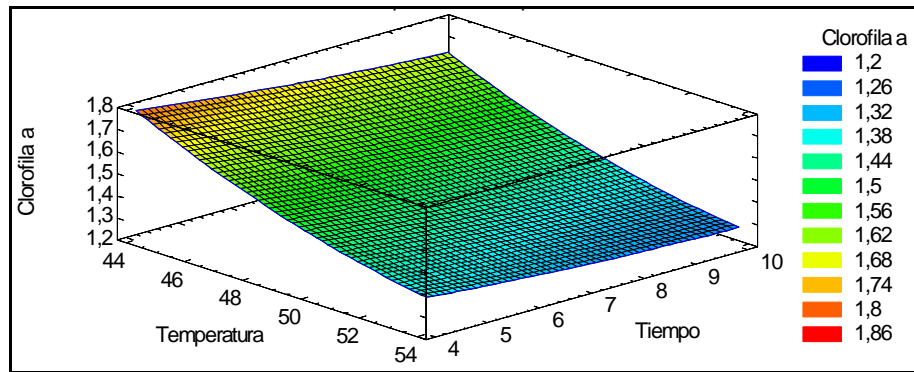
Grafica 38. Interacción para Clorofila a



Fuente: esta investigación

La grafica 39, muestra la superficie de respuesta indicando las combinaciones de los factores tiempo y temperatura y su comportamiento respecto a la cantidad de clorofila a y a su vez indica que la temperatura es el factor que ejerce mayor efecto en la disminución de la cantidad de clorofila a.

Grafica 39. Superficie de respuesta estimada para Clorofila a

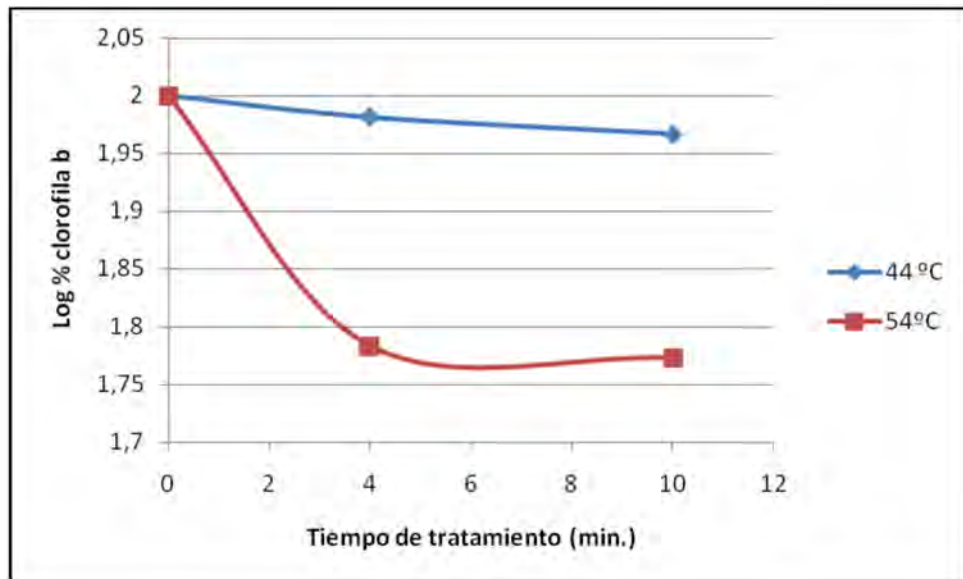


Fuente: esta investigación

Clorofila b

La Grafica 40 muestra que la clorofila b por acción de la temperatura y el tiempo de exposición a esta reduce su concentración este efecto es de una manera inversamente proporcional.

Grafica 40. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la clorofila b



Fuente: esta investigación

Cuadro29. Análisis de Varianza para Clorofila b

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	0,706466	1	0,706466	88,21	0,0000
B:Tiempo	0,0692246	1	0,0692246	8,64	0,0065
AA	0,0000071704	1	0,0000071704	0,00	0,9763
AB	0,000404446	1	0,000404446	0,05	0,8238
BB	0,000498319	1	0,000498319	0,06	0,8048
bloques	0,00234853	2	0,00117426	0,15	0,8643
Error total	0,224255	28	0,00800912		
Total (corr.)	1,0032	35			

R-cuadrado = 77,646 por ciento

Estadístico Durbin-Watson = 2,4369 (P=0,8254)

Fuente: esta investigación

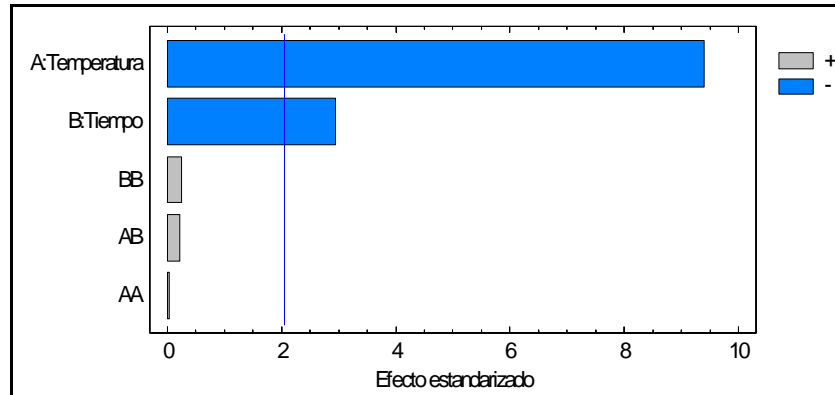
El cuadro 29, muestra la variabilidad de Clorofila b en partes separadas para cada uno de los efectos, prueba la significancia estadística de cada efecto en este caso Temperatura (A) y Tiempo (B) tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-cuadrado muestra un 77,646% de la variabilidad en Clorofila b. El estadístico de Durbin-Watson con un valor-P mayor que 5,0%, indica que no hay autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

El diagrama 7, indica los estimados del Cuadro25 graficado en barras en orden decreciente, los efectos Temperatura (A) y Tiempo (B) son significativos sobre la cantidad de clorofila b con un nivel de confianza del 95%. Mientras que los efectos de la interacción Tiempo-Tiempo (BB), Temperatura-Tiempo (AB) y Temperatura-Temperatura (AA) no presentan una significancia.

Los factores temperatura y tiempo ejercen un efecto inversamente proporcional sobre la cantidad de clorofila b, es decir que cada uno de estos factores causa una disminución considerable en la cantidad de clorofila b.

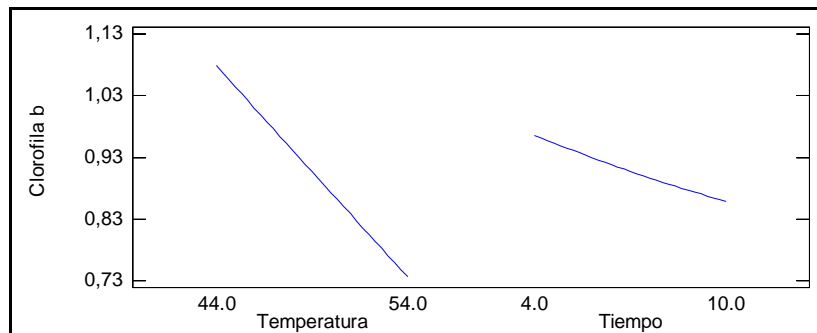
Diagrama 7. Diagrama de Pareto estandarizada para Clorofila b



Fuente: esta investigación

La Grafica 41 indica que la temperatura es el factor que causa más efecto sobre la disminución de clorofila b, con una mayor disminución a una temperatura de 54 °C a un tiempo de 10 minutos.

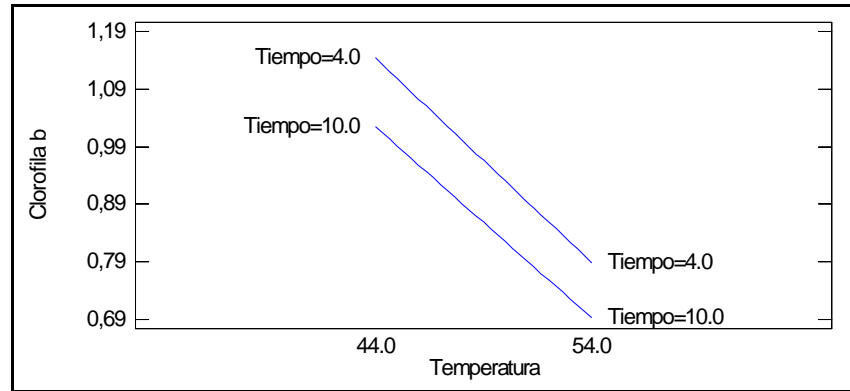
Grafica 41. Efectos principales para Clorofila b



Fuente: esta investigación

En la grafica 42, se observa la interacción que representa cada uno de los tiempos a 4 y 10 minutos en curvas diferentes, en las cuales se observa que el tiempo de 10 minutos es el factor que causa más efecto sobre la disminución de la cantidad de clorofila b, comparado su comportamiento desde los 44 °C hasta los 54°C donde se presenta la mayor disminución de este pigmento fotosintético.

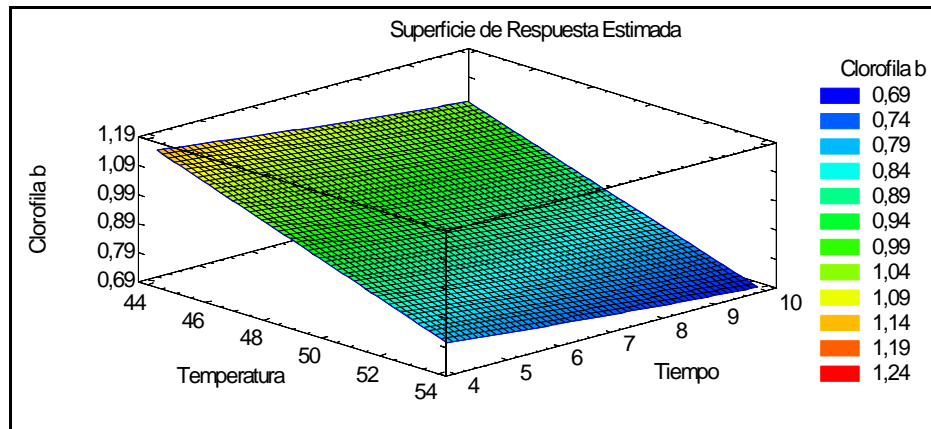
Grafica 42. Interacción para Clorofila b



Fuente: esta investigación

La Grafica 43 muestra la superficie de respuesta de los factores tiempo y temperatura y su comportamiento respecto a la cantidad de clorofila b, también muestra que la temperatura es el factor que ejerce mayor efecto en la disminución de la cantidad de clorofila b.

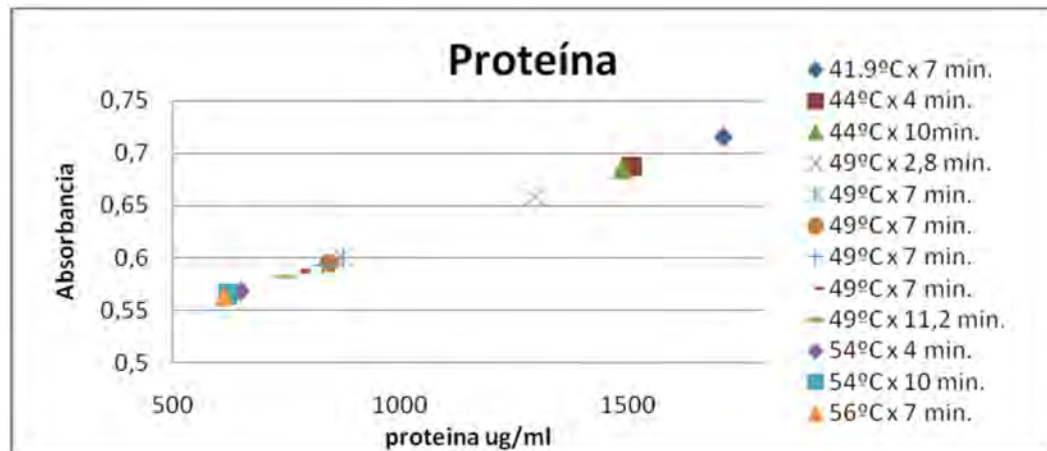
Grafica 43. Superficie de respuesta estimada para Clorofila a



Fuente: esta investigación

6.2.3. Cuantificación de proteína. La Grafica 42 muestra la cantidad de proteína en $\mu\text{g/mL}$ vs la absorbancia presente después de someter al producto a cada una de las combinaciones del tratamiento térmico.

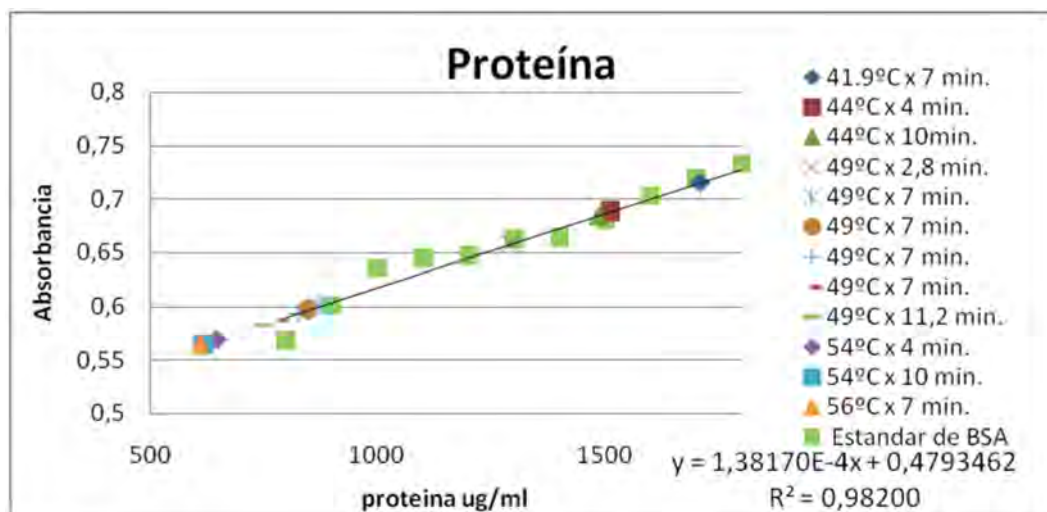
Grafica 44. Concentración de proteína después del tratamiento según diseño estadístico para aire caliente.



Fuente: esta investigación

En la Grafica 45 se observa la cantidad de proteína después del tratamiento térmico ubicado en la curva del estándar de proteína BSA que se encuentra en un rango de 800 a 2000 µg/ml

Grafica 45. Curva de calibración de estándar de BSA de 800 – 2000 µg/ml y Concentración de proteína después del tratamiento con aire caliente.



Fuente: esta investigación

Cuadro30. Análisis de Varianza para Proteína

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	4,03898E6	1	4,03898E6	452,91	0,0000
B:Tiempo	256694,	1	256694,	28,78	0,0000
AA	476493,	1	476493,	53,43	0,0000
AB	23,0911	1	23,0911	0,00	0,9598
BB	150306,	1	150306,	16,85	0,0003
bloques	13933,4	2	6966,72	0,78	0,4676
Error total	0,249699	28	8917,81		
Total (corr.)	5,10074E6	35			

R-cuadrado = 95,1047 por ciento

Estadístico Durbin-Watson = 2,51699 (P=0,8801)

Fuente: esta investigación

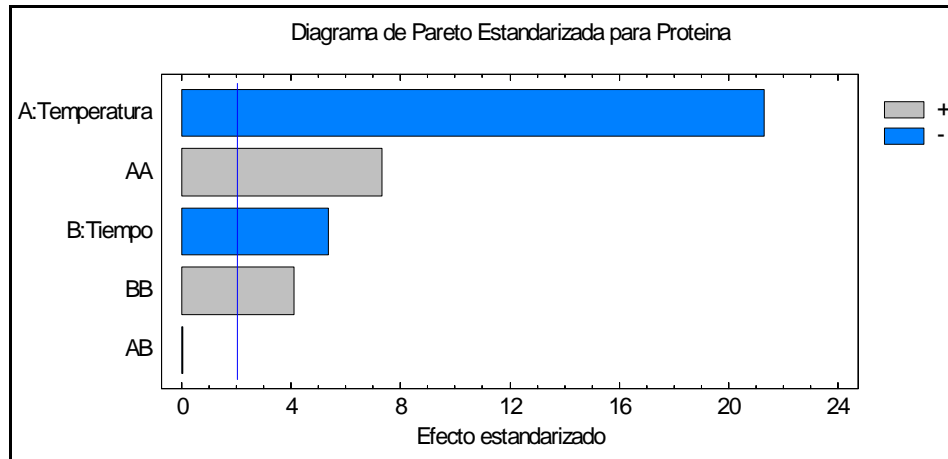
El cuadro 30, muestra la variabilidad de Proteína en partes separadas para cada uno de los efectos Temperatura (A), Tiempo (B), la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y la interacción Tiempo-Tiempo con un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-cuadrado indica un 95,1047% de la variabilidad en Proteína. El estadístico de Durbin-Watson muestra que no hay autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 95%.

El diagrama 8, indica los estimados del Cuadro 25 graficado en barras en orden decreciente de acuerdo a la significancia para cada efecto Temperatura (A), la interacción Temperatura-Temperatura (AA), Tiempo (B) y la interacción Tiempo-Tiempo (BB) son significativos sobre la cantidad de proteína con un nivel de confianza del 95%. Mientras que los efectos de la interacción Temperatura-Tiempo (AB) no presentan significancia.

Los factores temperatura y tiempo ejercen un efecto inversamente proporcional sobre la cantidad de proteína, es decir que cada uno de estos factores causa una disminución considerable sobre la proteína, ocurre lo contrario con la interacción Temperatura-Temperatura (AA) y Tiempo-Tiempo (BB).

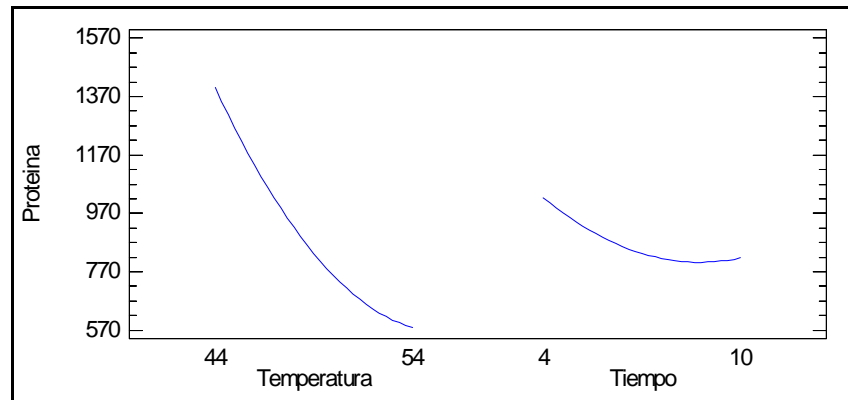
Diagrama 8. Diagrama de Pareto estandarizada para Proteína.



Fuente: esta investigación

La Grafica 46 de efectos principales para proteína indica que la temperatura es el factor que causa más efecto sobre la disminución de proteína, se observa una mayor disminución a una temperatura de 54 °C con un tiempo de 10 minutos.

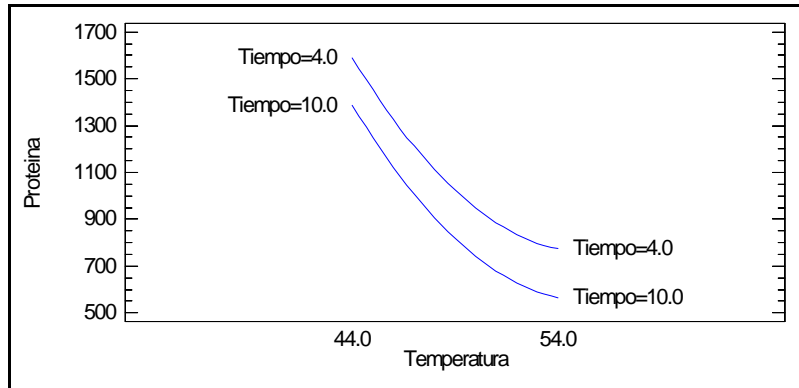
Grafica 46. Efectos principales para Proteína.



Fuente: esta investigación

En la Grafica 47 se observa la interacción que representa cada uno de los tiempos a 4 y 10 minutos en graficas diferentes con respecto a la temperatura y a su vez con la interacción sobre la cantidad de proteína, en las cuales se observa que el tiempo de 10 minutos es el factor que causa más efecto sobre la disminución de la cantidad de proteína comparado su comportamiento desde los 44 °C hasta los 54°C donde se presenta la mayor disminución.

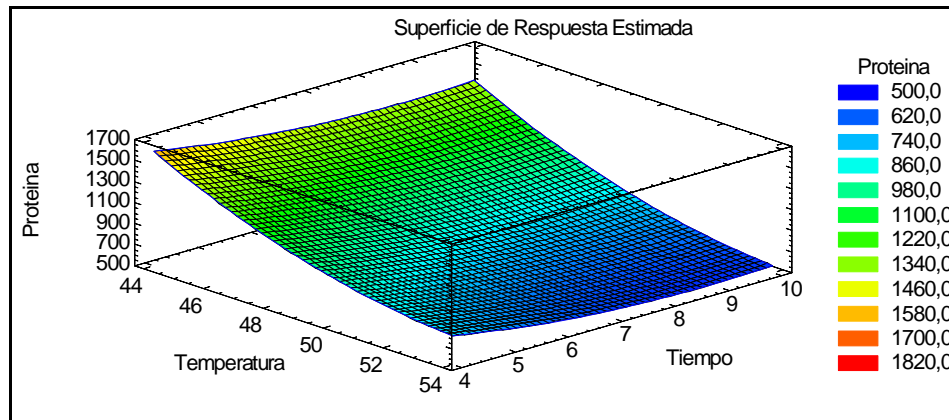
Grafica 47. Interacción para Proteína.



Fuente: esta investigación

La Grafica 48 muestra la superficie de respuesta de los factores tiempo y temperatura y su comportamiento respecto a la cantidad de proteína, también se observa que la temperatura es el factor que ejerce mayor efecto en la disminución de proteína a los 54 °C.

Grafica 48. Superficie de respuesta estimada para Proteína.



Fuente: esta investigación

6.2.4. Seguimiento en almacenamiento al ambiente. Al producto tratado por inmersión en agua con la combinación de factores que brindó una menor cantidad de enzima residual se le realizó un seguimiento en condiciones de almacenamiento a una temperatura ambiente por 8 días realizando análisis consecutivos día tras día de actividad enzimática, cantidad de proteína y contenido de pigmentos fotosintéticos, los datos promedios obtenidos de 3 replicas se muestran en el Cuadro 31. Para el estudio los datos obtenidos se grafican en Microsoft office excel 2007 y se analizan con ayuda del software estadístico InfoStat.

Cuadro31. Seguimiento en almacenamiento.

Días	%AR	Clorofila a mg/g	Clorofila b mg/g	Proteína ug/ml
0	18,528	1,336	0,798	806,641
1	18,642	1,332	0,795	860,198
2	19,016	1,312	0,718	878,050
3	22,163	1,305	0,674	867,435
4	24,936	1,297	0,670	1031,002
5	27,379	1,271	0,686	1173,579
6	28,169	1,262	0,685	1250,055
7	29,784	1,260	0,682	1496,611
8	31,285	1,245	0,660	1506,743

Fuente: esta investigación

En las gráficas 49, 50, 51 y 52 se observa el comportamiento de los parámetros evaluados durante el almacenamiento, en el día séptimo se observa un amarillamiento del producto es decir el límite óptimo del brócoli (*Brassica oleracea* L) variedad Legacy, para su comercialización

La Gráfica 49 muestra una actividad de la enzima residual constante los 2 primeros días, a partir de este tiempo se observa un aumento progresivo de la actividad, la Gráfica 50 muestra una disminución de la cantidad de clorofila a día tras día, en el día 6 y 7 no se observa un cambio considerable en la concentración de este pigmento fotosintético, a partir de este tiempo se observa una degradación progresiva.

La Gráfica 51 de concentración de clorofila b muestra un comportamiento constante el primer día luego una disminución considerable hasta el tercer día donde presenta un leve aumento de este pigmento hasta el día 5 donde se mantiene constante hasta el día 7 donde empieza nuevamente una disminución de la concentración.

La Gráfica 52 muestra un leve aumento en la concentración de enzima POD hasta el tercer día, a partir de este día se observa un aumento considerable de la enzima hasta el día 7 donde se observa un comportamiento constante hasta el día 8.

Las gráficas 50 y 51 presentan una disminución continua de pigmentos fotosintéticos los cuales son degradados y transformados en carotenoides, feofitinas y pigmentos amarillos y marrones (Yoshio *et al.*, 2003; Rodés G. *et al.*, 2006; Bermudez *et al.*, 1995) estos defectos ocasionados en el brócoli son causados por la reactivación de la enzima POD que se observa en las gráficas 47 y 50. al igual que Thongsook *et al.*, (2007) quien describe una reactivación de POD

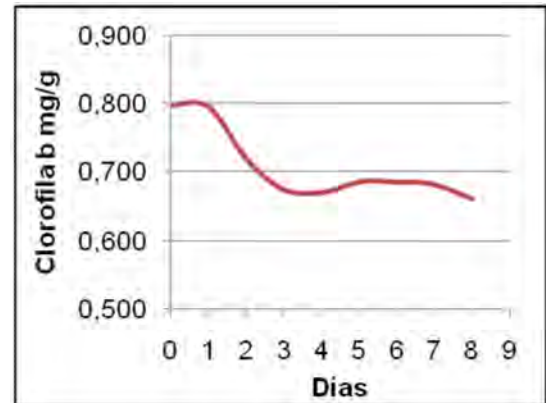
del el 80 % después de un tratamiento de 80 °C por 1 min. Y de 60, 55, and 65% de tratamientos a 100 °C por 5 min, 70 °C por 1 hora y 7 min at 100 °C respectivamente.

Grafica 49. Días vs % AER.



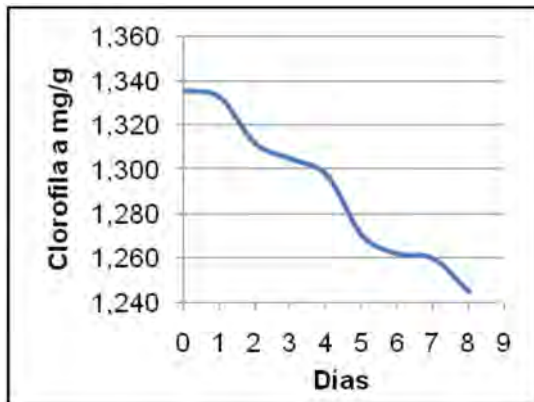
Fuente: esta investigación

Grafica 50. Días vs mg/g de Clorofila b.



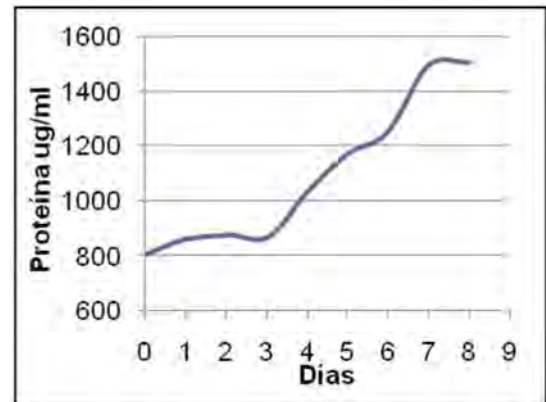
Fuente: esta investigación

Grafica 51. Días vs mg/g de Clorofila a.



Fuente: esta investigación.

Grafica 52. Días vs ug/ml de proteína.



Fuente: esta investigación

Cuadro32. Análisis de la varianza para % AER

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Actividad de la enzima residual	27	1,00	1,00	0,19

Cuadro de Análisis de Varianza.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	604,11	8	75,51	34315,46	<0,0001
TIEMPO	604,11	8	75,51	34315,46	<0,0001
Error	0,04	18	2,2E-03		
Total	604,15	26			

Cuadro33. Test de Tukey para % AER

Alfa=0,05 DMS=0,13421

Error: 0,0022 gl: 18

TIEMPO	Medias	n	E. E.							
	18,53	3	0,03	A						T0
T1	18,64	3	0,03	A						
T2	19,02	3	0,03		B					
T3	22,16	3	0,03			C				
T4	24,94	3	0,03				D			
T5	27,38	3	0,03					E		
T6	28,17	3	0,03						F	
T7	29,78	3	0,03							G
T8	31,29	3	0,03							H

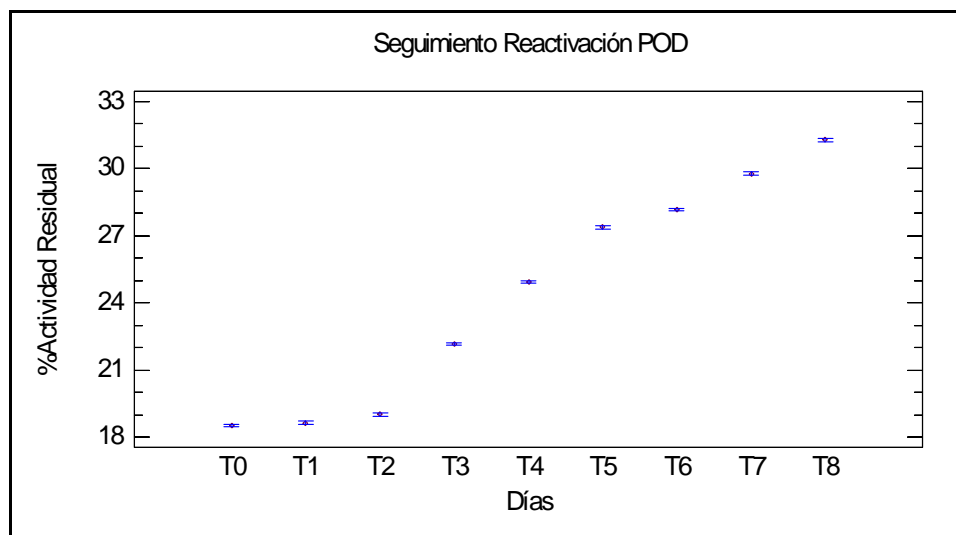
Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0,05$)

Fuente: esta investigación

El análisis de varianza (Cuadro32) explica en un 100 % la variabilidad del %AER, con esto se puede deducir que el diseño cuenta con un excelente ajuste permitiendo hacer un análisis confiable sobre el porcentaje de actividad de la enzima residual. El análisis muestra diferencia altamente significativa entre los días analizados ya que su p-valor es menor de 0,0001.

El test de Tukey(Cuadro 33) muestra que los días 0 y 1 son significativamente similares, los días consecutivos hasta el día octavo son significativamente diferentes con un p -valor $\leq 0,05$, es decir que a medida que aumentan los días se presenta un aumento significativo en la enzima residual expresado en su actividad. El análisis indica una reactivación significativa de la POD en el transcurso del tiempo evidenciado en la Grafica 53.

Grafica 53. Grafica de medias para reactivación de POD



Fuente: esta investigación

Cuadro34. Análisis de la Varianza para clorofila a

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila a mg/g	27	1,00	1,00	0,01

Cuadro de Análisis de Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	8	3,2E-03	441916,30	<0,0001
TIEMPO	0,03	8	3,2E-03	441916,30	<0,0001
Error	1,3E-07	18	7,3E-09		
Total	0,03	26			

Cuadro35. Test de Tukey para clorofila a

Alfa=0,05 DMS=0,00025

Error: 0,0000 gl: 18

TIEMPO	Medias	n	E.E.							T8
	1,25	3	4,9E-05	A						
T7	1,26	3	4,9E-05	B						
T6	1,26	3	4,9E-05	C						
T5	1,27	3	4,9E-05	D						
T4	1,30	3	4,9E-05	E						
T3	1,30	3	4,9E-05	F						
T2	1,31	3	4,9E-05	G						
T1	1,33	3	4,9E-05	H						
T0	1,34	3	4,9E-05	I						

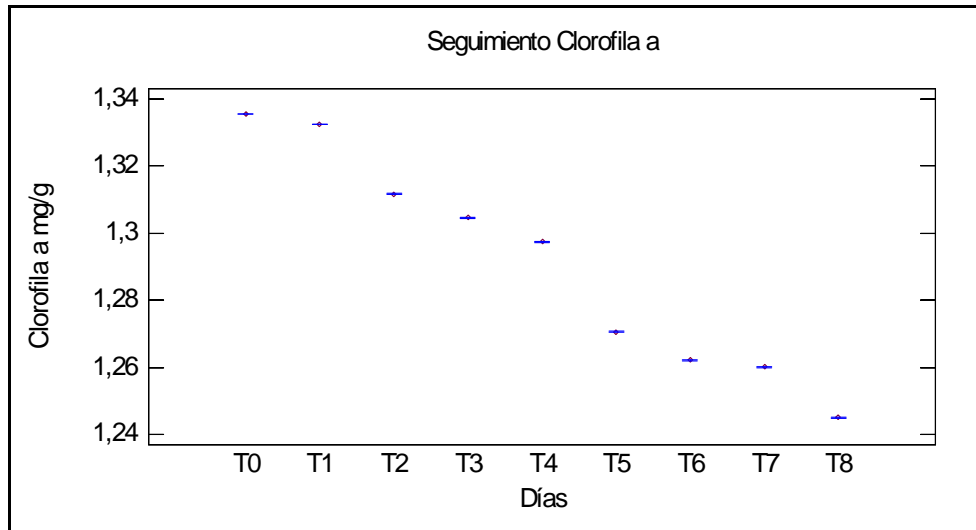
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0,05)

Fuente: esta investigación

El análisis de varianza Cuadro34 explica en un 100 % la variabilidad en la degradación de clorofila a, el análisis muestra diferencia altamente significativa con un p-valor menor de 0,0001.

El test de Tukey que se muestra en el Cuadro35 y la grafica 54, indican que a medida que aumenta el tiempo se presenta una disminución en la cantidad de clorofila a. El análisis de medias muestra una menor cantidad de clorofila en el día 8 y una mayor cantidad el día cero, a la vez indica que todos los días presentan concentraciones de clorofila significativamente diferentes con un p-valor menor igual a 0,05 y una diferencia mínima significativa de 0,00025 .

Grafica 54. Grafica de medias para degradación de clorofila a



Fuente: esta investigación

Cuadro36. Análisis de varianza para clorofila b

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Clorofila b mg/g	27	1,00	1,00	0,31

Cuadro de Análisis de Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	8	0,01	1744,56	<0,0001
TIEMPO	0,07	8	0,01	1744,56	<0,0001
Error	8,6E-05	18	4,8E-06		
Total	0,07	26			

Cuadro37. Test de Tukey para clorofila b

Alfa=0,05 DMS=0,00626

Error: 0,0000 gl: 18

TIEMPO	Medias	n	E.E.			
T8	0,66	3	1,3E-03	A		
T4	0,67	3	1,3E-03		B	
T3	0,67	3	1,3E-03		B	
T7	0,68	3	1,3E-03			C
T6	0,69	3	1,3E-03			C
T5	0,69	3	1,3E-03			C
T2	0,72	3	1,3E-03			D
T1	0,79	3	1,3E-03			E
T0	0,80	3	1,3E-03			E

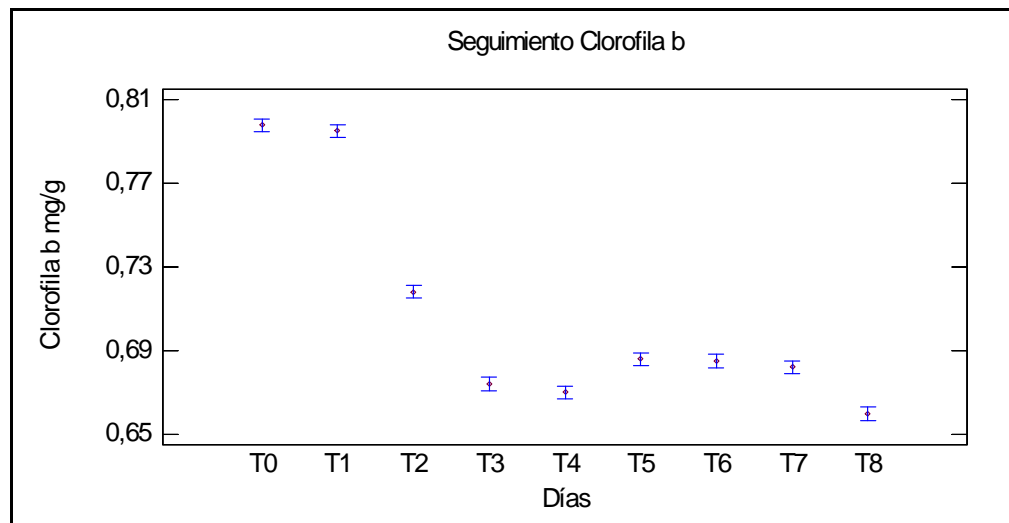
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0,05)

Fuente: esta investigación

El Cuadro36 de análisis de varianza explica en un 100% la variabilidad en la degradación de clorofila b, con una diferencia altamente significativa y un p-valor menor de 0,0001.

El test de Tukey (Cuadro37) muestra que a medida que aumenta el tiempo se presenta un aumento en la degradación de clorofila b. El análisis de medias y la Grafica 55 muestran que en los días 0 y 1 no se presenta cambios en la cantidad de clorofila b, al igual que en los días 5, 6 y 7 y en los días 3 y 4 indicando este comportamiento con una letra común donde se indica que no son significativamente diferentes con un p-valor menor igual a 0,05 y una diferencia mínima significativa de 0,00626.

Grafica 55. Grafica de medias para degradación de clorofila b



Fuente: esta investigación

Cuadro38. Análisis de varianza para degradación de proteína

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PROTEINA ug/ml	27	1,00	1,00	0,89

Cuadro de Análisis de Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1806734,97	8	225841,87	2349,81	<0,0001
TIEMPO	1806734,97	8	225841,87	2349,81	<0,0001
Error	1729,99	18	96,11		
Total	1808464,96	26			

Cuadro39. Test deTukeypara degradación de proteína.

Alfa=0,05 DMS=28,04704

Error: 96,1106 gl: 18

TIEMPO	Medias	n	E.E.	
T0	806,64	3	5,66	A
T1	860,20	3	5,66	B
T3	867,44	3	5,66	B
T2	878,05	3	5,66	B
T4	1031,00	3	5,66	C
T5	1173,58	3	5,66	D
T6	1250,05	3	5,66	E
T7	1496,61	3	5,66	F
T8	1506,74	3	5,66	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0,05$)

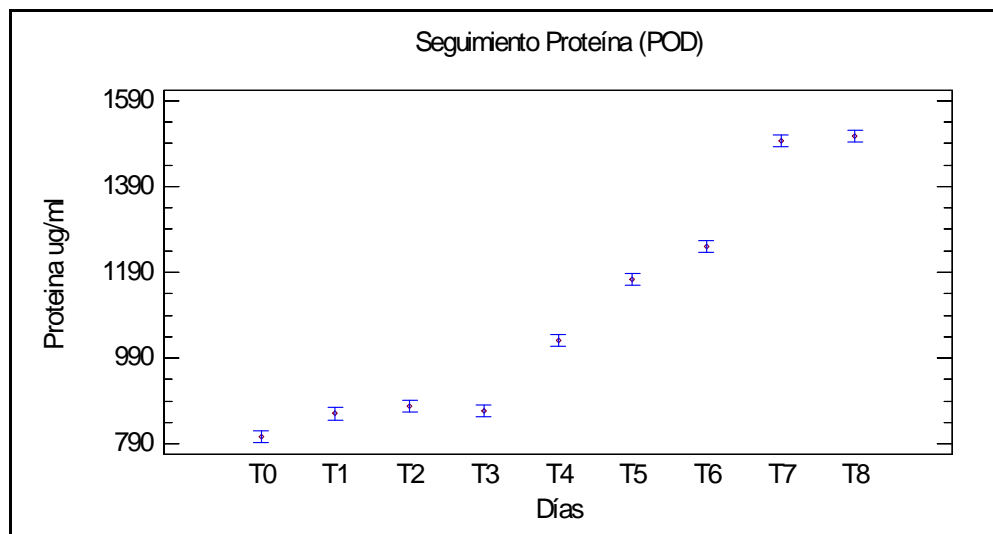
Fuente: esta investigación

El análisis de varianza Cuadro38explica en un 100 % la variabilidad en la degradación de proteína, con un p-valor menor de 0,0001.

En elCuadro 39 se observa que a medida que aumenta el tiempo se presenta un aumento progresivo de proteína (peroxidasa). El análisis de medias con una diferenciamínima significativa de 28,04704 muestra que los rangos de los días 1-3 y 7-8 no presentan un cambio estadísticamente significativo en la cantidad de proteína, lo cual se muestra con una letra común donde se indica que son significativamente diferentes con un p-valor menor igual a 0,05, de igual manera se observa en la

Grafica 56.

Grafica 56. Grafica de medias para reactivación de proteína (POD)



Fuente: esta investigación

7. CONCLUSIONES

El desarrollo del diseño estadístico arrojó que el mejor tratamiento es el realizado con aire caliente a una temperatura de 55 °C por 3 horas, porque con él se obtiene una actividad de la enzima residual de peroxidasa menor (11%). El tratamiento por inmersión en agua que presentó un resultado más aceptable es la combinación de 54°C por 10 minutos con una actividad de la enzima residual del 18 %.

El tratamiento por aire caliente evitó el amarillamiento, sin alterar el color propio del brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy durante 8 días, con una degradación de clorofila a del 9,6 % y de clorofila b del 7,9 %, por tanto el tratamiento por aire caliente aplicado se presenta como una opción satisfactoria para almacenamiento al ambiente, incrementando así su vida comercial.

En almacenamiento a temperatura ambiente (17 °C) el brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy presentó un 3,8 % de reactivación enzimática expresada como cantidad de proteína durante 8 días de almacenamiento.

El tiempo y la temperatura presentan un efecto inversamente proporcional con la cantidad de POD, clorofila a y b presentes en brócoli (*Brassicaoleracea* L) variedad Legacy.

La temperatura es el factor que más influye en la reducción enzimática.

La temperatura influye en la reducción de clorofila a y con mayor efecto sobre la disminución de clorofila b, es decir que la clorofila a es más termorresistente.

8. RECOMENDACIONES

Realizar trabajos de investigación sobre el comportamiento de las propiedades organolépticas, sensoriales y fisicoquímicas después del tratamiento térmico.

Realizar la investigación en los subproductos (tallos) y su utilización en la parte alimentaria por su alto contenido nutricional y farmacéutica por su alto contenido de selenio.

Investigaciones similares en otras variedades mejoradas genéticamente.

BIBLIOGRAFIA.

Agostini Elizabeth, Medina María I. and Milrad de Forchetti Silvia R. and Tigier, Horacio Properties of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from Turnip (*Brassica napus* L.) Roots. [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 1997. - Vol. 45. - pp. 596-598.

Alimentacion Sana y Natural Propiedades De Los Alimentos - Nutricion www.alimentacion-sana.com.ar [Online]. - Diciembre 1, 2007. - Febrero 14, 2010. - [http://www.alimentacion-sana.com.ar/hortalizas/Propiedades del brécol/web](http://www.alimentacion-sana.com.ar/hortalizas/Propiedades%20del%20br%C3%A9col/web).

Anthon Gordon E. and Barrett Diane M. Kinetic Parameters for the Thermal Inactivation of Quality-Related Enzymes in Carrots and Potatoes [Journal] // Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50. - 2002. - pp. 4119-4125.

Avallone Carmen, Crauzov Alicia, Montenegro Susana and Pellizzari, Esther Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinesterasa y polifenol oxidasa en extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgaris* Schard) [Journal]. - 2000.

Badui S. Química de los Alimentos [Book]. - Mexico : Editorial Alambra Mexicana, 1999.

Bahceci K.S., Serpen Arda, Gökmen Vural and Acar Jale Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage [Journal] // Journal of Food Engineering, Vol. 66. - 2005. - pp. 187–192.

Bermudez Ana Silvia and Guzman Rodriguez Rosa QUIMICA DE LOS ALIMENTOS [Book]. - SANTA FE DE BOGOTA D.C. : Unisur, 1995. - pp. 359-362.

Calvo Miguel www.milksci.unizar.es [Online]. - 12 01, 2009. - 06 13, 2010. - <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/clorofila.html>.

Cano M. Pilar, Lobo M. Gloria and Begoña de Ancos and Galeazzi M. Antonia. Polyphenol Oxidase from Spanish Hermaphrodite and Female Papaya Fruits (*Carica papaya* Cv. Sunrise, Solo Group) [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 1996. - Vol. 44. - pp. 3075-3079.

Carvalho Ana Sofia, Pinho Eduardo, Ferreira Bruno, Neves-Petersen Maria Teresa, Petersen Steffen B. and Aires-Barrosa Maria Raquel Heme and pH-dependent stability of an anionic horseradish peroxidase [Journal] // Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.415. - 2003. - pp. 257–267.

CODEX ALIMENTARIUS. www.sagarpa.gob.mx [En línea]. - 1 de Diciembre de 1981. - 29 de Marzo de 2010. - http://www.sagarpa.gob.mx/v1/agricultura/info/comp/it/normas/pfv/CXS_110-1981_BRECOLES_CONG_RAPID.pdf.

Cruz R. M. S, Vieira M. C and Silva C. L. M. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*) [Journal] // Journal of Food Engineering.. - 2006.

Duarte Lucía Estrella Baquero, Rivera Jhon Alexander Castro and Cuenca Carlos Eduardo Narváez Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia [Journal] // Acta Biológica Colombiana, Vol. 10 No. 2. - 2005. - p. 49.

Duarte Vázquez Miguel A., García Padilla Sandra, García Almendárez Blanca E., Whitaker John R. and Regalado Carlos Broccoli Processing Wastes as a Source of Peroxidase [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 2007. - p. 55.

Duarte-Vásquez Miguel A., Whitaker John R., Rojo-Domínguez Arturo, García Almendárez Blanca E. and Regalado Carlos Isolation and Thermal Characterization of an Acidic Isoperoxidase from Turnip Roots [Journal] // Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol.51. - 2003. - pp. 5096-5102.

Servicio de Informacion y Censo Agropecuario (SICA)ECUADOR www.sica.gov.ec [En línea]. - 1 de Junio de 2004. - 20 de Marzo de 2010. - <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/hortalizas/broccoli/corpei.pdf>).

Estrada Berta, Bernal María A, Diaz José, Pomar Federico and Merino Fuencisla Fruit Development in *Capsicum annum*: Changes in Capsaicin, Lignin, Free Phenolics, and Peroxidase Patterns [Journal] // Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 48. - 2000. - pp. 6234-6239.

FAO Organizacion de Agricultura y Alimentos www.fao.org [Online]. - Diciembre 1, 2005. - Marzo 12, 2010. - <http://www.faostat.fao.org>.

Fernandez Sevilla Jose Maria Escaldado y pelado a vapor [Journal] // Tecnologia de alimentos. - 2004. - pp. 1-4.

Fernandez-Trujillo J. Pablo, Nock Jacqueline F., Kupferman Eugene M., Brown Susan K. and Watkins Christopher B Peroxidase Activity and Superficial Scald Development in Apple Fruit . [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 2003. - Vol. 51. - pp. 7182-7186.

Finger Fernando Luiz, Endres Laurício, Mosquim Paulo Roberto and Puiatti Mário. Physiological changes during postharvest senescence of broccoli. [Journal] // Pesq. agropec. bras., vol.34, n.9. - 1999. - pp. 1565-1569.

Finley John W., Ip Clement, Lisk Donald, Davis Cindy D., Hintze Korry J. and Whanger Phil D. Cancer-Protective Properties of High-Selenium Broccoli [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 2001. - p. 49.

Forsyth J. L. and Robinson D. S. Purification of Brussels sprout isoperoxidases [Journal] // Food Chemistry, Vol. 63, No. 2. - 1998. - pp. 221-234.

Forsyth J.L., Owusu Apenten R.K. and Robinson D.S. The thermostability of purified isoperoxidases from Brassica oleracea VAR. gemmifera [Journal] // Food Chemistry, Vol. 65. - 1999. - pp. 99-109.

Fukumoto Lana R. and Toivonen Peter M. A. and Delaquis, Pascal J. Effect of Wash Water Temperature and Chlorination on Phenolic Metabolism and Browning of Stored Iceberg Lettuce Photosynthetic and Vascular Tissues. [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 2002. - 50. - pp. 4503-4511.

Funamoto Yoshio, Yamauchi Naoki, Shigenaga Tetsuya and Shigyo Masayoshi Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (Brassica oleracea L.) [Journal] // Postharvest Biology and Technology, Vol. 24. - 2002. - pp. 163–170.

Funamoto Yoshio, Yamauchi Naoki and Shigyo Masayoshi Control of isoperoxidases involved in chlorophyll degradation of stored broccoli (Brassica oleracea) florets by heat treatment [Journal] // Journal of Plant Physiology. - 2006. - Vol. 163. - pp. 141 - 146.

Gallardo Castro Miguel Angel Validación Experimental de un Software Asistido por Internet para Describir el Proceso Combinado Escaldado - Hidroenfriado en Floretes de Brócoli (Brassica oleracea L. var italica) [Report] : TESIS. - VALDIVIA – CHILE : FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, 2004.

Gonçalves E.M., Cruz R.M.S., Abreu M., Brandão T.R.S., Silva C.L.M. Biochemical and colour changes of watercress (Nasturtium officinale R. Br.) during freezing and frozen storage [Journal] // Journal of Food Engineering, Vol. 93. - 2009. - pp. 32–39.

GoncalvesElsa M., Pinheiro Joaquina, Alegria Carla, Abreu Marta, Brandao Teresa R. S. and Silva Cristina L. M. Degradation Kinetics of Peroxidase Enzyme, Phenolic Content, and Physical and Sensorial Characteristics in Broccoli (Brassica oleracea L. ssp. Italica) during Blanching [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 2009. - 57. - pp. 5370–5375.

Griffiths D. Wynne, Bain Henry and Dale M. Finlay Effect of Storage Temperature on Potato (Solanum tuberosum L.) Tuber Glycoalkaloid Content and the Subsequent Accumulation of Glycoalkaloids and Chlorophyll in Response to Light Exposure. [Journal]. - [s.l.] : J. Agric. Food Chem., 1998. - Vol. 46. - pp. 5262-5268.

Halpin B, Pressey R., Jen J, Mondy N. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*) [Journal] // J. Food Sci.. - , 1989. - pp. 644-649.

Hansberg TW. Biología de las especies de oxígeno reactivas [Journal] // Mensaje bioquímico 26. - 2002. - pp. 19-54.

ICBF Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. www.icbf.gov.co [Online] // Cuadro de composición de alimentos colombianos. - 03 12, 2011. - 05 18, 2011. - <http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co>.

IUPAC Technical Report UNIT “KATAL” FOR CATALYTIC ACTIVITY [Journal]. - [s.l.] : Pure Appl. Chem., 2001. - 6 : Vol. 73. - pp. 927–931.

Jaramillo Juan Factores que afectan la producción hortícola en Colombia. [Journal] // Programa de hortalizas y frutas. - 2000.

Lewis Michael J and Heppell N. J. Continuous Thermal Processing of Foods: Pasteurization and Uht Sterilization [Journal]. - 2004. - p. pp 44.

LINCO journal Escaldado por aire caliente – otra novedad revolucionaria [Journal] // Novedades Sobre La Producción Mundial. - 2004. - p. 1.

Lurie S. Postharvest heat treatment. [Journal] // Postharvest Biol Technol, Vol.14. - 1998. - pp. 257–69.

Machado María F and Saraiva Jorge Inactivation and reactivation kinetics of horseradish peroxidase in phosphate buffer and buffer-dimethylformamide solutions [Journal] // Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. - 2002.

Maestre S. Ronald Y. Expresión y determinación de la actividad enzimática de las isoenzimas de L-lactato: NAD Oxido-Reductasa [Report] : Tesis. - Bogotá D. C. : Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Biología, 2004.

Mafart Pierre Ingeniería Industrial alimentaria [Libro]. - Zaragoza (España) : Acribia S.A., 1994.

Matsui K. N, Granado L. M, De Oliveira P. V, Tadini C. C. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. [Journal] // LWT 40. - 2007. - pp. 852 – 859.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural(MADR) COLOMBIA www.agronet.gov.co. [En línea]. - 1 de Diciembre de 2008. - 20 de marzo de 2010. - <http://www.agronet.gov.co/agronetweb/>.

Morales-Blancas E. F, Chandia V. E and Cisneros- Zevallos L. Thermal Inactivation Kinetics of peroxidase and lipoxigenase from broccoli, green

asparagus and carrots [Journal] // Journal of food science. Vol 67. N° 1. - 2002. - pp. 146- 154.

Moreno Rodriguez Katherine Proyecto Empresarial “Estudio De Factibilidad Para La Produccion De Hortalizas En La Zona Rural Del Municipio De Tabio Cundinamarca.- Universidad de la Salle – Bogota, Colombia. - 2008.

Naoki Yamauchi, Funamoto Yoshio and Masayoshi Shigyo. Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops [Journal] // Phytochemistry Reviews. - 2004. - pp. 221-228.

Naoki Yamauchi, Kaori Harada and Alley E Watada In vitro chlorophyll degradation in stored broccoli (Brassica oleracea L. 6ar. italica Plen.) florets [Journal] // Postharvest Biology and Technology . - 1997. - pp. 239-245.

Narvaez C Extraccion y medida de peroxidasa en pulpa de araza. [Book]. - Bogota : [s.n.], 2008.

Ndiaye Cheickh, XU Shi Ying and Wang Zhang Steam Blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (Mangifera indica) slices [Journal] // Food Chemistry, Vol. 113. - 2009. - pp. 92-95.

Olesen J.E. and Grevsen K. A simulation model of climate effects on plant productivity and variability in cauliflower (Brassica Oleracea). [Journal] // Scientia Hort. - 2000. - pp. 83- 107.

Percival GC and Baird, L. Influence of Storage upon Light-Induced Chlorogenic Acid Accumulation in Potato Tubers (Solanum tuberosum L.) [Journal]. - [s.l.] : Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. - 6 : Vol. 48. - pp. 2476-2482.

Polata Halina, Wilinska Alina, Bryjak Jolanta, Polakovic Milan Thermal inactivation kinetics of vegetable peroxidases [Journal] // Journal of Food Engineering, Vol.91. - 2009. - pp. 387–391.

Robinson D.S Peroxidase and catalasa in food [Journal] // Elsevier Applied Science. - 1991. - pp. 1- 49.

Rodés G. Rosa and Collazo O. Margarita Manual de Prácticas Fotosíntesis [Book]. - [s.l.] : las prensas de ciencias, 2006.

Rodriguez Katherine Moreno Estudio de factibilidad para la producción de hortalizas en la zona rural del municipio de Tabio Cundinamarca. [Journal]. - 2008. - p. 96.

Rudra S. G, Shivhare U. S and Basu Santanu. Termal inactivation kinetics of peroxidasa in mint leaves [Journal] // Journal of Food Engineering 85. - 2008. - pp. 147 – 153.

Sanjuan N., Benedito J. and Clemente G. and Mulet, A. The influence of blanching pretreatments on the quality of dehydrated broccoli stems [Journal] // Food Science and Technology International. - 2000. - Vol. 6. - p. 227.

Schmalko Miguel E, Scipioni Patricia G, Ferreyra Darío J, Alzamora Stella Maris Efecto de la Actividad del Agua y la Temperatura en la Degradación de la Clorofila y el Color en Hojas de Yerba Mate [Journal] // Universidad Nacional de Buenos Aires – Argentina.. - 2003. - p. 9.

Schrauzer G.N., White D.A. and Schneider C.J. Cancer mortality correlation studies III. Statistical associations with dietary selenium intakes [Journal] // Bioinorg Chem. - 1997. - pp. 7; 23-31..

Schweiggert U, Schieber A. and Carle R. Inactivation of peroxidase, polyphenol oxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material [Journal] // Innovative Food Science and Emerging Technologies. - 2005-Vol. 6. - págs. 403-411.

Seminis www.seminis.com.mx [Online]. - Noviembre 16, 2009. - Marzo 29, 2010,- **MEXICO** - <http://www.seminis.com.mx/products/broccoli/legacy.asp>.

Sessa David J. and Anderson Robert L. Soybean peroxidases: purificación and some properties [Journal] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 1981.

Silva Filipa V.M and Gibbs Pau Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products [Journal] // Critical reviews in food science and nutrition. - 2004.

Soysal Cigde and Soylemez Zerrin. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. [Journal] // Journal of Food Engineering.. - 2005. - 3 : Vol. 68. - pp. 349 – 356.

Thongsook Tipawan and Barret Diane M.(a) Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase [Journal] // Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 53. - 2005. - pp. 3215-3222.

Thongsook Tipawan and Barrett Diane M. (b) Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 2005. - p. 53.

Thongsook Tipawan, Whitaker John R., Smith Gary M. and Barrett Diane M. Reactivation of Broccoli Peroxidases: Structural Changes of Partially Denatured Isoenzymes [Journal]. - [s.l.] : J. Agric. Food Chem., 2007. - Vol. 55. - pp. 1009-1018.

Tijskens L. M. M., Rodis P. S., Hertog M. L. A., Waldron K. W., Ingham L., Proxenia N. and Van Dijk C. Activity of Peroxidase during Blanching of Peaches,

Carrots and Potatoes [Journal] // Journal of Food Engineering, Vol. 34. - 1997. - pp. 355-370.

Vallejo Franco Alirio Hortalizas en Colombia [Publicación periódica] // Director del Grupo de Investigación de Hortalizas Universidad de Colombia sede Palmira-V.. - 2004.

Woolf Tian M.S. and Ferguson Bowen J.H. Changes in color and chlorophyll fluorescence of broccoli florets following hot water treatment. [Journal] // J. Amer. Soc. Hort. Sci. Vol 131. - 1996. - pp. 310-313..

www.ehu.es Cinética Enzimática [Online] // www.ehu.es. - 04 28, 2011. - <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#ae>.

Yemenicioglu Ahmet, Ozkan Mehmet and Cemeroglu Bekir Partial Purification and Thermal Characterization of Peroxidase from Okra (*Hibiscus esculentum*) [Journal] // Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 46. - 1998. - pp. 4158-4163.

Yoshio Funamoto, Naoki Yamauchi and Masayoshi Shigyo participación de peroxidasa en la degradación de clorofila en almacenamiento de brócoli (*Brassica oleracea* L.), e inhibición de la actividad mediante tratamiento térmico [Journal] // Postharvest Biology and Technology. - 2003. - pp. 39-46.