



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# **EFFECTO COMBINADO DE LA APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y *STEVIA* *REBAUDIANA* SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA**



**MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Marta Civera Civera  
Directora: M<sup>a</sup> Dolores Rodrigo Aliaga  
Codirector: Antonio Martínez López  
Directora experimental: María Nieves Criado García  
Centro: IATA-CSIC  
Valencia, Septiembre 2012

## RESUMEN

La relación existente entre los alimentos, la salud y el bienestar ha impulsado al sector agroalimentario a investigar la aplicación de tecnologías de procesado alternativas a la térmica tradicional que permitan conseguir alimentos estables, con características lo más similar posible al alimento fresco, de alta calidad sensorial, inocua y saludable. El objetivo del presente trabajo de investigación consistió en evaluar el efecto del uso de las altas presiones hidrostáticas (HPP), como tecnología alternativa a la térmica convencional, en combinación con la adición de un ingrediente natural con capacidad antioxidante (*Stevia rebaudiana*) sobre la actividad de enzimas oxidativas implicadas en el pardeamiento enzimático, polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD), procedentes de un extracto enzimático obtenido por la combinación de pulpa de papaya, mango y naranja. Los resultados obtenidos indican que el uso de *Stevia rebaudiana* inhibe la actividad de las enzimas oxidativas, ejerciendo mayor efecto sobre la POD. La aplicación de las HPP provoca inactivaciones de un 97 y un 94% en las enzimas PPO y POD, respectivamente. Además, la adición de estevia potencia, aún más si cabe, el efecto inhibitor de las HPP. De acuerdo con ello, dada la capacidad antioxidante atribuida a las hojas de *Stevia rebaudiana*, ésta podría ser utilizada como agente antipardeamiento reduciendo la actividad de las enzimas oxidativas, POD y PPO, evitando la pérdida de calidad nutricional y organoléptica de las frutas.

## RESUM

La relació existent entre els aliments, la salut i el benestar ha impulsat al sector agroalimentari a investigar l'aplicació de tecnologies de processat alternatives a la tèrmica tradicional que permeten obtenir aliments estables amb característiques el més semblant possible a l'aliment fresc, d'alta qualitat sensorial, innòcua i saludable. L'objectiu del present treball d'investigació va consistir en avaluar l'efecte de l'ús de les altes pressions hidrostàtiques (HPP) com tecnologia alternativa a la tèrmica convencional, en combinació amb l'adició d'un ingredient natural amb capacitat antioxidant (*Stevia rebaudiana*) sobre l'activitat d'enzims oxidatius implicats en l'enfosquiment enzimàtic, polifenoloxidasas (PPO) i peroxidasa (POD), procedents d'un extracte enzimàtic obtingut per la combinació de polpa de papaia, mango i taronja. Els resultats obtinguts indiquen que l'ús de *Stevia rebaudiana* inhibeix l'activitat dels enzims oxidatius, exercint major efecte sobre la POD. L'aplicació de les HPP produeix inactivacions d'un 97% i d'un 94% en els enzims PPO i POD, respectivament. A més, l'adició d'estevia potencia, encara més si és possible, l'efecte inhibitor de les HPP. D'acord amb això, donada la capacitat antioxidant atribuïda a les fulles de *Stevia rebaudiana*, aquesta podria ser utilitzada com agent antienfosquiment reduint l'activitat

dels enzims oxidatius, POD i PPO, evitant la pèrdua de qualitat nutricional i organolèptica de les fruites.

## ABSTRACT

The relationship between food, health and welfare has encouraged the agri-food sector to investigate the implementation of processing technologies alternatives to the traditional thermal allowing to achieve stable food, with features as similar as possible to the fresh, high quality sensory, safe and healthy food. The objective of the present research work was to assess the effect of the use of high hydrostatic pressure (HHP), as a technology alternative to the thermal treatment, combined with the addition of a natural ingredient with antioxidant capacity (*Stevia rebaudiana*) on the activity of oxidative enzymes involved in the enzymatic browning, polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD), from an enzymatic extract obtained by the combination of papaya, mango and orange pulps. The results obtained showed that the use of *Stevia rebaudiana* inhibits the oxidative enzymes, causing the greater effect on the POD. HPP treatment inactivated 97 and 94 % of POD and PPO, respectively. Furthermore, the addition of stevia improved the inhibitory effect of the HPP. Accordingly, given the antioxidant capacity attributed to the leaves of *Stevia rebaudiana*, it could be used as an antibrowning agent reducing the activity of oxidative enzymes, POD and PPO, avoiding the loss of nutritional and organoleptic quality of the fruits.

**PALABRAS CLAVE:** POD, PPO, *Stevia rebaudiana*, pardeamiento enzimático, agente antipardeamiento, altas presiones hidrostáticas (HHP).

## INTRODUCCIÓN

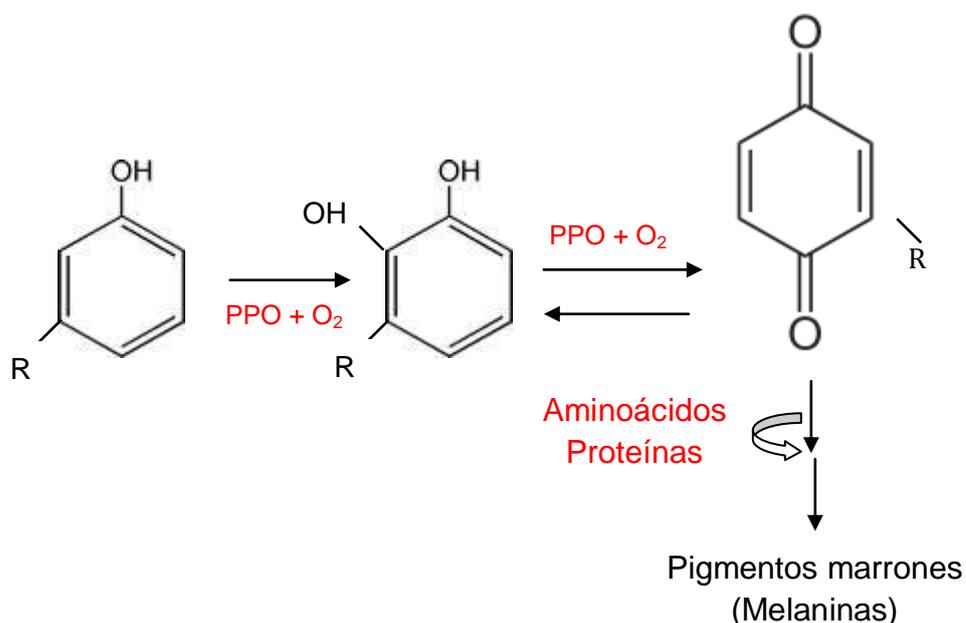
Actualmente mediante la ingesta de alimentos se busca mejorar la salud, el bienestar y la prevención de enfermedades. En los últimos años ha habido una mayor concienciación por parte del consumidor en la relación dieta-salud y en el consumo de productos frescos mínimamente procesados, que han originado un mayor impulso y esfuerzo en la búsqueda de nuevas alternativas para los tratamientos de conservación de alimentos. Es decir, se están potenciando tratamientos que reduzcan los efectos negativos sobre las características sensoriales y nutricionales y que como resultado, se obtenga un producto de alta calidad, inocuo y saludable.

En el marco de la tendencia actual, resulta de gran interés el estudio de las tecnologías no térmicas, como son los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF) y las altas presiones hidrostáticas (HPP). Las HPP son un proceso físico basado en someter un producto a presiones elevadas, que oscilan entre 100 a 1000 MPa, pero que en particular, las aplicaciones comerciales existentes utilizan intervalos de presión entre 400 y 600 MPa, inactivando los microorganismos no esporulados, reduciendo significativamente la actividad enzimática y minimizando las pérdidas de micronutrientes, pigmentos, aromas (Terefe et al., 2010). Sin embargo, estas

tecnologías, por sí mismas, son menos efectivas en cuanto a la inactivación microbiana y enzimática que las térmicas convencionales. Por ello, para extender su uso en la industria agroalimentaria, se pueden combinar éstas con la aplicación de ingredientes naturales que pueden actuar como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antipardeamiento, etc. (Raso y Barbaso-Cánovas, 2003).

De esta forma se pretende estudiar el uso combinado de las HPP con la adición de un ingrediente natural con características antioxidantes, en concreto la ***Stevia rebaudiana* (Bertoni)**, arbusto perenne que pertenece a la familia de las asteráceas, nativo de ciertas regiones de América del Sur (Brasil y Paraguay), donde los extractos de las hojas se han utilizado como edulcorante natural desde hace cientos de años (Chaturvedula et al., 2011). Los principios activos que le confieren sabor dulce son los glicósidos del esteviol, en concreto, esteviósidos y rebaudiósidos. Además, el extracto seco procedente de sus hojas también contiene compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes (Tadhani et al., 2007), confiriéndole propiedades antimicrobianas (Atteh et al., 2008) y antioxidantes (Il-Suk et al., 2011). Es por sus propiedades antioxidantes, por lo que se ha seleccionado para el presente estudio. Cabe decir, que son pocos los trabajos de investigación realizados en los que se atribuye la capacidad antioxidante a los extractos procedentes de las hojas de *S. rebaudiana*, y en todos ellos la capacidad se determina a partir de métodos químicos como por ejemplo TEAC, DPPH, ORAC entre otros (Wölwer-Rieck, 2012). Sin embargo, actualmente no hay información disponible en bibliografía sobre el efecto antioxidante frente a enzimas oxidativas, como por ejemplo la polifenoloxidasas y peroxidasa.

La polifenoloxidasas (PPO, E.C.1.14.18.1) es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles a o-quinonas en presencia de oxígeno, utilizando el cobre como grupo prostético y originando la formación de pigmentos marrones (melaninas) producidos por la polimerización de las quinonas en presencia de aminoácidos y proteínas (Figura 1) (Cheikh et al., 2009; Álvarez-Parrilla et al., 2005).



### FIGURA 1. Mecanismo de acción de la enzima polifenoloxidasa.

La peroxidasa (POD, E.C.1.11.1.7) forma parte de un gran grupo de enzimas conocidas como oxidorreductasas que catalizan la oxidación de una amplia gama de sustancias naturales presentes en alimentos de origen vegetal descomponiendo el peróxido de hidrógeno en presencia de un dador de hidrógeno, según la siguiente reacción:



En la que en el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es generalmente el sustrato oxidante (ROOH), el  $\text{AH}_2$  el sustrato dador y el  $\text{A}^*$  es un radical libre. Para el análisis de la POD se usan dadores de hidrógeno que al oxidarse dan compuestos con grupos cromóforos que normalmente absorben en el visible. Entre los dadores de hidrógeno más conocidos se encuentran los mono y polifenoles, aminofenoles, diaminas, indofenoles, aminoácidos con grupos reactivos, ácido ascórbico, etc. Los más utilizados son el guayacol, ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), o-dianisidina, pirogalol y el ácido ascórbico.

Ambas enzimas son las responsables de las reacciones de pardeamiento enzimático (Tomás-Barberán y Espín, 2001) que tienen lugar como consecuencia de la manipulación, el almacenamiento y el procesamiento de frutas y verduras frescas, provocando el deterioro de la calidad de las mismas (McEvily et al., 1992). Es por ello que su inactivación o inhibición de su actividad es indicador de una mayor calidad de los productos frescos. Uno de los métodos más comunes utilizados para la prevención del pardeamiento enzimático es el uso de agentes inhibidores. Estos compuestos actúan de manera directa sobre la enzima o reaccionan con los sustratos y/o productos de las reacciones catalizadas por la POD o la PPO, inhibiendo la formación de pigmentos que ocasionan coloraciones inaceptables para el consumidor. El mecanismo de acción de los agentes antipardeamiento es diferente según la naturaleza de los mismos (McEvily et al., 1992): reducción química (ácido ascórbico, L-cisteína, glutatión), quelación (EDTA, fosfatos), inhibición de la enzima (varios compuestos derivados del resorcinol), agentes acomplejantes (ciclodextrinas), etc. (Rapeanu et al., 2006; Rojas-Graü et al., 2008; Oms-Oliu et al., 2006; Alvarez-Parrilla et al., 2007).

Dada la capacidad antioxidante atribuida a las hojas de *Stevia rebaudiana*, ésta podría ser utilizada como agente antipardeamiento reduciendo la actividad de enzimas oxidativas, POD y PPO, y evitando la pérdida de calidad nutricional y organoléptica de frutas y verduras.

En nuestro estudio, papaya, mango y naranja han sido seleccionados como frutas ricas en compuestos antioxidantes, entre ellos, compuestos fenólicos, los cuales son sustrato de reacciones oxidativas catalizadas por la PPO y la POD (Tomás-Barberán y Espín, 2001). La papaya (*Carica papaya*) es una planta herbácea de rápido crecimiento que se cosecha en casi todas

las regiones tropicales, y en España, especialmente en las Islas Canarias. Destaca por su sabor, calidad nutricional y propiedades digestivas. Tiene un alto contenido en carotenoides, flavonoides, potasio, fibra y ácido ascórbico (Lim et al., 2007) y es una de las frutas con mayor capacidad antioxidante (Murcia et al., 2001). El mango (*Mangifera indica*) es uno de los principales frutos tropicales que destaca por su delicioso sabor y aroma. Presenta un alto contenido en carotenoides, vitaminas A, C y E, fibra dietética, y compuestos fenólicos que le aportan una elevada capacidad antioxidante (Cheikh et al., 2009). La capacidad antioxidante de la naranja (*Citrus sinensis, variedad Salustiana*) se debe a su contenido en vitamina C, ácido ascórbico, carotenos y polifenoles (Acevedo et al., 2004).

Por todo ello el objetivo del presente trabajo de investigación consiste en evaluar el efecto del uso de una tecnología no térmica de conservación (altas presiones hidrostáticas, HPP) en combinación con la adición de un ingrediente natural con capacidad antioxidante (*Stevia rebaudiana*) sobre la actividad de enzimas oxidativas, polifenoloxidasas y peroxidasas, procedentes de un extracto enzimático obtenido por la combinación de pulpa de papaya, mango y naranja.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Materia prima**

Los frutos de papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*) y naranja (*Citrus sinensis, variedad Salustiana*) fueron adquiridos en un supermercado local de Valencia, en su punto de maduración óptimo, y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Las hojas secas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) fueron suministradas por la empresa Anagalide (Barbastro, Huesca) y almacenadas a temperatura ambiente.

### **Métodos**

#### **PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN**

Se prepara una infusión stock al 8,33% a partir de las hojas de estevia. Para ello se lleva a ebullición 100 mL de agua embotellada sobre la que se añaden 8,33 g de hojas de estevia. La infusión se cubre con papel de aluminio y se deja reposar 30 minutos. Se filtra con la ayuda de una bomba de vacío a través de papel de filtro Whatman™ nº 1 (Circles, 90 mm de diámetro, Cat No 1001 090). El filtrado obtenido se almacena en viales de 2 mL a -40 °C.

#### **OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO**

El proceso de extracción se lleva a cabo por el procedimiento descrito por Rodrigo et al., 1996, con algunas modificaciones. Todo el procedimiento se

realiza a 4 °C. Se pesan 100 g de pulpa de fruta, papaya, mango y naranja en relación 65:20:15, y se trituran durante 5 minutos a la máxima velocidad en una batidora de cuchillas de acero inoxidable con 100 mL de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7) que contiene NaCl 1 M (Scharlab S.L. Spain) y 5% PVPP (Sigma-Aldrich.Co.St Louis, MO.USA). El homogeneizado se filtra a vacío a través de una capa de lino con Buchner y Kitassatos sumergido en hielo y se centrifuga a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante constituye el extracto enzimático.

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La capacidad antioxidante de la estevia y el efecto de la aplicación de las HPP se evaluarán bajo el punto de vista de su efectividad en la inhibición de la actividad de las enzimas oxidativas PPO y POD. Para ello, se llevaron a cabo ensayos con diferentes concentraciones de infusión de estevia (1,25 y 2,5%) y a distintas temperaturas de almacenamiento (12, 24,5 y 37 °C) en muestras tratadas y no por HPP. Los resultados se compararán con un control (sin infusión de estevia y/o sin tratamiento HPP).

Consideramos como volumen total del ensayo 20 mL, y preparamos las distintas concentraciones estudiadas según se refleja en la siguiente tabla:

**TABLA 1:** Composición final de las muestras analizadas.

% <i>Stevia rebaudiana</i>	Volumen de extracto enzimático (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen de infusión al 8,33% (mL)
0	14	6	0
1,25	14	3	3
2,5	14	0	6

## MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)

La actividad POD se mide espectrofotométricamente según el procedimiento descrito por Rodrigo et al., 1996. En cada ensayo enzimático se añaden 200 µL del extracto en un tubo junto con 3800 µL de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7) que contiene NaCl 1 M y se agita durante 5 minutos. Después se atempera el tubo durante 7 minutos en un baño a 25 °C. Se toman 2,39 mL del tubo y se introducen en una cubeta de poliestireno para hacer el blanco. La reacción se inicia al adicionar 0,61 mL de una mezcla reactiva que contiene peróxido de hidrógeno y guayacol (18,77 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%, 1 mL de guayacol puro y aforamos a un volumen final de 25 mL con agua bidestilada). Para determinar la actividad enzimática se mide la absorbancia de la reacción enzimática a 470 nm cada segundo durante 150 s con la ayuda de un espectrofotómetro UV/V Lan Optics Mod. PG 1800 conectado a un ordenador provisto del software UV-win 5.0.5. Cada determinación se realiza por triplicado.

## MEDIDA DE LA ACTIVIDAD POLIFENOLOXIDASA (PPO)

La actividad PPO se mide espectrofotométricamente según el procedimiento descrito por Giner et al., 2001. El método está basado en el incremento en la absorbancia a 410 nm producido cuando se mezclan 1950  $\mu\text{L}$  de pyrocatecol 0,05 M (Sigma-Aldrich.Co.St Louis, MO.USA) en tampón fosfato sódico (0,05 M; pH 7; con NaCl 1M), con 100  $\mu\text{L}$  de extracto en la cubeta de reacción. Cada determinación se realiza por triplicado. Al igual que para el caso de la POD, para determinar la actividad enzimática se mide la absorbancia de la reacción enzimática a 410 nm cada segundo durante 150 s con la ayuda de un espectrofotómetro.

Para ambas enzimas, la actividad enzimática se calcula a partir de la pendiente del tramo lineal de la curva que muestra la evolución de la absorbancia con respecto al tiempo. Una unidad de actividad de POD o de PPO se expresa como un incremento de absorbancia (a 470 o a 410 nm, respectivamente, en las condiciones en las que se está realizando el ensayo) por minuto y mL de extracto ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}\cdot\text{mL}$  extracto).

En ambos casos, la velocidad inicial de reacción se expresa como actividad relativa (RA), calculado a partir de la ecuación 1:

$$\text{RA} = A/A_0 \quad (1)$$

donde: A = Actividad POD o PPO en un tiempo dado;  $A_0$  = Actividad inicial de POD o PPO.

## TRATAMIENTO POR HPP

El tratamiento por HPP se lleva a cabo mediante el equipo EPSI NV (Temse, Bélgica) disponible en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. El equipo consta de una vasija con una capacidad de 2,3 L, puede trabajar entre -5 y 60 °C y con una presión máxima de 600 MPa. El procesado por HPP se llevará a cabo a tres niveles de presión (300, 400 y 500 MPa), a 3 tiempos de tratamiento (5, 10 y 15 min) y a 22 °C. Las muestras a tratar (según composición tabla 1), se introducen en bolsas de tratamiento selladas en el interior de la vasija.

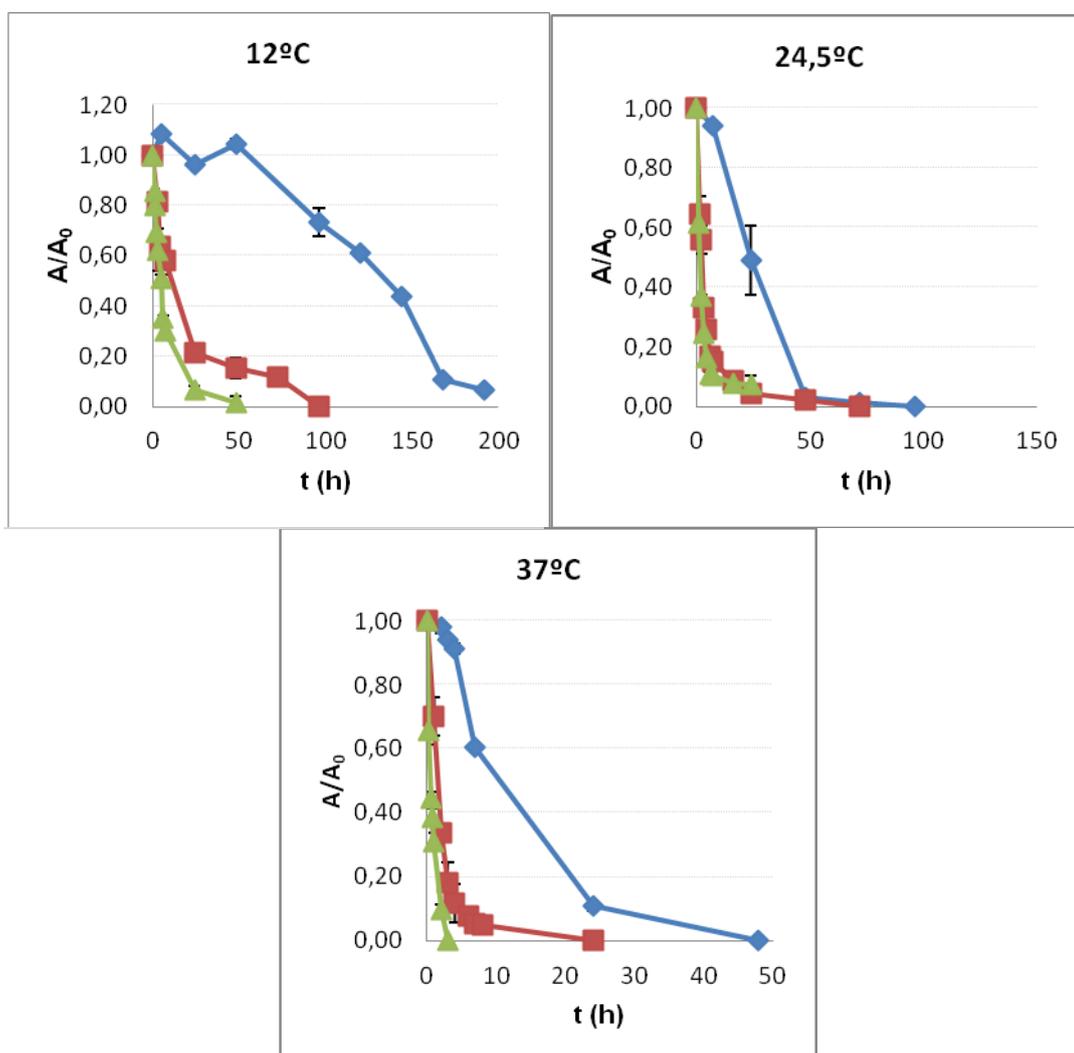
## Diseño experimental

La aplicación de un diseño centrado compuesto fue necesario para evaluar el efecto conjunto de la aplicación de las HPP en presencia de estevia sobre las actividades POD y PPO con 4 variables independientes: presión y tiempo de tratamiento, concentración de estevia y temperatura de incubación del extracto post-tratamiento. Para ello se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XV (Statgraphs Inc.), resultando un total de 26 tratamientos. Para cada medida de actividad enzimática se realizan 3 repeticiones y se calcula la media aritmética y la desviación típica de las mismas.

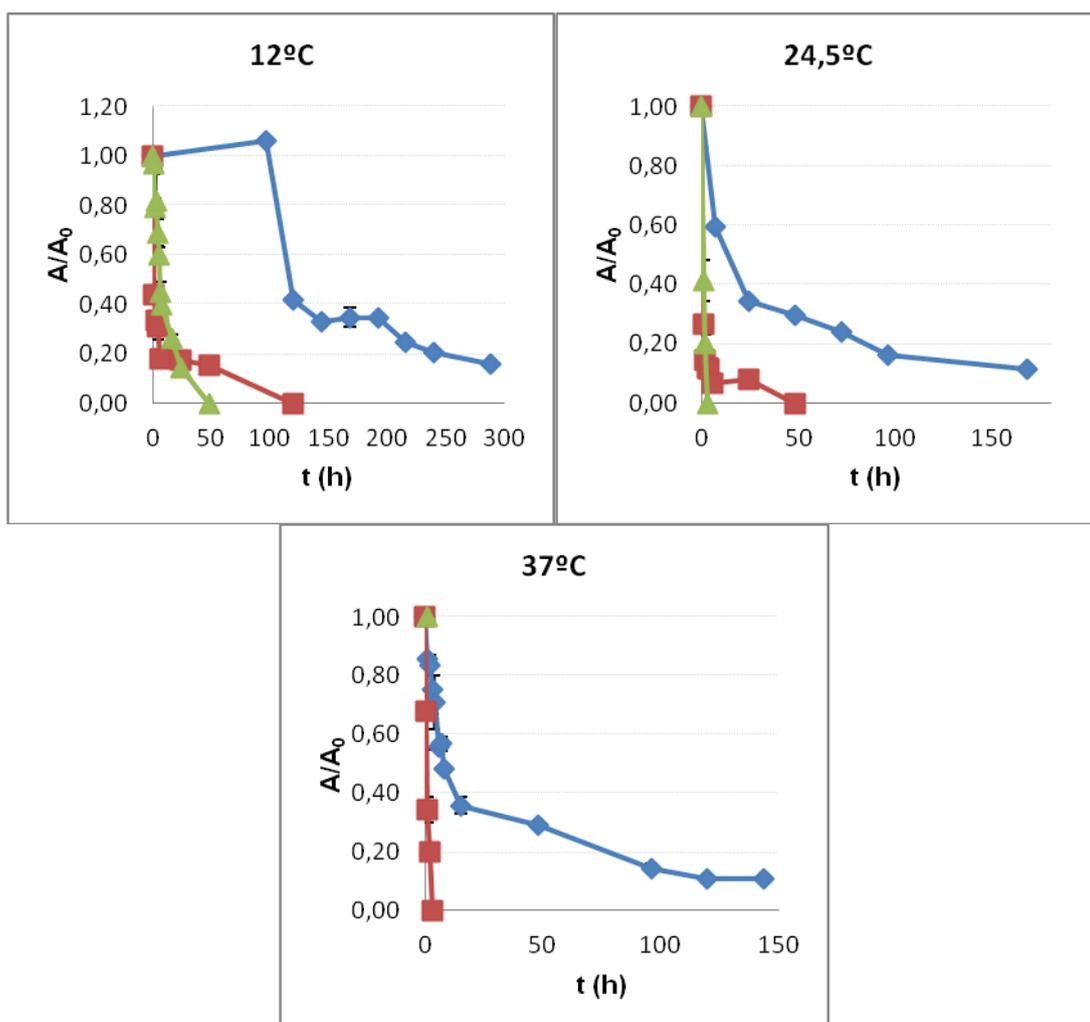
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1) Efecto de la adición de un ingrediente natural con capacidad antioxidante (*S. rebaudiana*) sobre la actividad polifenoloxidasas y peroxidasa

En las siguientes figuras, se han representado las curvas de degradación de las enzimas PPO (figura 2) y POD (figura 3) obtenidas determinando la actividad residual ( $A/A_0$ ) frente al tiempo (h), después de haber sido almacenadas a distintas temperaturas (12, 24,5 y 37 °C) en presencia de distintas concentraciones de estevia (0, 1,25 y 2,5%). Como puede apreciarse la actividad de ambas enzimas se ve afectada por distintos factores tales como la temperatura de incubación, el tiempo de almacenamiento así como por las distintas concentraciones de estevia.



**FIGURA 2:** Curvas de degradación de la PPO a diferentes temperaturas (12, 24,5 y 37 °C) en presencia de diferentes concentraciones de estevia (0:  $\blacklozenge$ ; 1,25:  $\blacksquare$  y 2,5:  $\blacktriangle$ ).



**FIGURA 3:** Curvas de degradación de la POD a diferentes temperaturas (12, 24,5 y 37 °C) en presencia de diferentes concentraciones de estevia (0: ◆; 1,25: ■ y 2,5%: ▲).

Para ambas enzimas en ausencia de estevia, a mayor temperatura de incubación, la velocidad de degradación es mayor. Para el caso de la PPO, a 12 °C existe actividad enzimática después de ocho días de incubación, a 24,5 °C después de tres días, mientras que, a la mayor temperatura de almacenamiento ensayada (37 °C) no se detecta actividad PPO después de 2 días de almacenamiento de la muestra. En el caso de la POD, existe actividad enzimática después de doce, siete y seis días de incubación a 12, 24,5 y 37 °C, respectivamente. Estos resultados muestran que la POD es más resistente a la degradación que la PPO independientemente de la temperatura de incubación. Este efecto es mayor a 37 °C, ya que existe actividad de la enzima POD después de seis días de almacenamiento, mientras que la actividad enzimática de la PPO a la misma temperatura de incubación está por debajo del límite de detección del método sólo dos días después de su almacenamiento. Los resultados obtenidos en ausencia de estevia en el presente trabajo coinciden, para el caso de la polifenoloxidasas,

con lo mencionado por Nagai y Suzuki, 2001, en coliflor (*Brassica rapa* L.). La solución enzimática fue almacenada a 4 °C durante 14 días y los resultados muestran que la actividad se mantuvo durante dos días, al tercer día empezó a disminuir y al séptimo día sólo quedaba un 15% de la actividad polifenoloxidasas inicial. Rapeanu et al., 2006, estudiaron el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la actividad de la PPO en uvas (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). A 25°C la enzima pierde completamente su actividad después de 45 días, mientras que a 4 °C pierde un 25% de la actividad durante los diez primeros días y sólo el 50%, tras 50 días de almacenamiento. Estudios llevados a cabo sobre el efecto de la temperatura de almacenamiento en la PPO y la POD en 2 variedades de mango (Wen et al., 2006) ponen de manifiesto que para ambas enzimas la temperatura óptima de almacenamiento fue la de 8 y 11 °C. De hecho, a 25 °C, la disminución en la actividad de ambas enzimas después de 10 días de almacenamiento fue mayor que la obtenida a temperaturas de almacenamiento menores. Estos experimentos mostraron que la temperatura más baja podría deprimir la actividad de la PPO y POD.

Por otro lado, la adición de un ingrediente natural con actividad antioxidante reduce la actividad enzimática siendo mayor el efecto al incrementar la concentración de estevia. Como puede verse en la figura 2, en ausencia de estevia existe actividad PPO después de 8 días de incubación del extracto a 12 °C, sin embargo la adición de estevia reduce la actividad PPO por debajo del límite de detección a 4 y 2 días, para las concentraciones de 1,25 y 2,5%, respectivamente. Este comportamiento es similar para ambas enzimas y para las diferentes concentraciones de inhibidor enzimático ensayadas. Por otro lado, existe además un efecto sinérgico entre la temperatura de incubación y la concentración de estevia, consiguiéndose una degradación más rápida a la máxima temperatura de almacenamiento y concentración de estevia ensayada. Para el caso de la PPO con una concentración de 1,25% de estevia, a 12 °C la actividad alcanza valores por debajo del límite de detección en cuatro días, a 24,5 °C en tres días y a 37 °C en un día, mientras que para la concentración de 2,5% de estevia a 12 °C se alcanza dicho valor en dos días, a 24,5 °C en un día, y a 37 °C después de 3 horas. En el caso de la POD, con una concentración de 1,25% de estevia, se detecta dicha actividad hasta los 5 días, 2 días y 3 horas a las temperaturas de almacenamiento de 12, 24,5 y 37 °C, respectivamente. Cuando la concentración de estevia es la máxima ensayada, a 12 °C el ensayo dura dos días, a 24,5 °C tres horas y a 37 °C las lecturas están por debajo del límite de detección del método. Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que la enzima más sensible a la estevia es la POD, obteniéndose una degradación más rápida en comparación con la PPO. El efecto es mayor a 2,5% de estevia y 37 °C, ya que existe actividad enzimática de la PPO durante las primeras dos horas de almacenamiento, mientras que la actividad de la POD, está por debajo del límite de detección del método desde el inicio del almacenamiento en las mismas condiciones de temperatura y concentración de inhibidor.

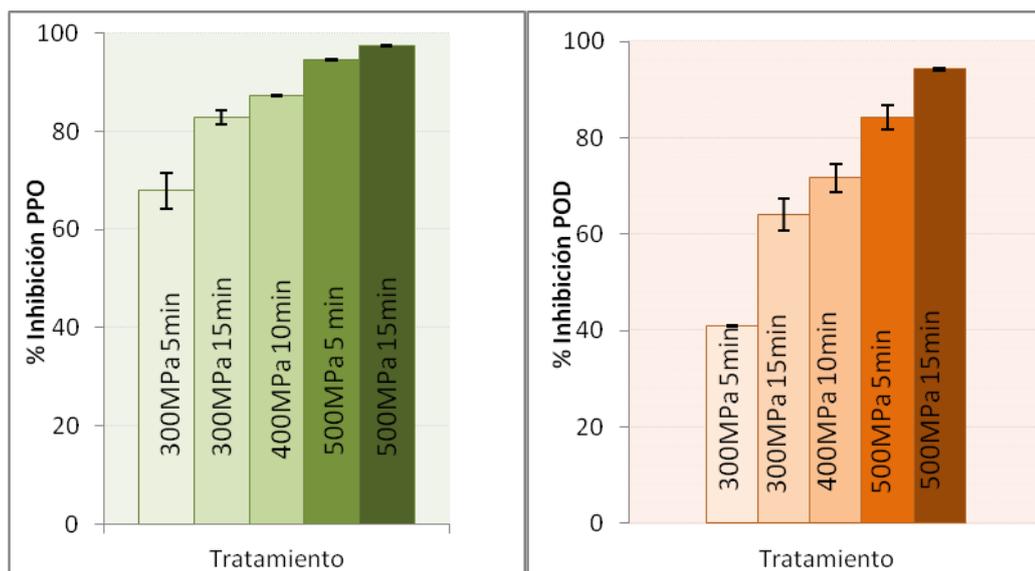
En lo referente a los resultados obtenidos con la adición de un ingrediente natural, al no haber bibliografía en relación a la utilización de la

estevia como agente antipardecimiento, nos basaremos en los resultados obtenidos por otros autores haciendo uso de diferentes inhibidores antipardecimiento. Estudios realizados por Álvarez-Parrilla et al., 2005 con otros inhibidores como la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), 4-hexilresorcinol (4HR) y metil jasmonato (MJ), solos y combinados, sobre la actividad de la PPO de manzana, muestran un diferente grado de inhibición enzimática. El uso de  $\beta$ -CD en combinación con 4-HR, a las concentraciones estudiadas, presentó un efecto sinérgico sobre la inhibición enzimática, lo cual podría tener importancia en la industria alimentaria para la conservación de manzana fresca cortada. Por otro lado, el MJ mostró tener menor afinidad por la enzima que  $\beta$ -CD y 4-HR y por ello una menor actividad inhibitoria. Otros estudios llevados a cabo en manzanas de la variedad Fuji (Rojas et al., 2008) utilizando como agentes antipardecimiento ácido ascórbico (AA), 4HR, N-acetil-L-cisteína (NAC) y glutatión reducido (GSH) y evaluando el efecto inhibitorio de los mismos sobre ambas enzimas oxidativas: POD y PPO, ponen de manifiesto que la enzima POD fue eficazmente inhibida por el uso combinado de ácido ascórbico junto con cualquiera del resto de agentes antipardecimiento estudiados. Por el contrario, sólo el uso individual de N-acetil-L-cisteína (NAC) o de GSH inhibió la actividad PPO, pero dicha actividad se incrementó después de 6 días de almacenamiento a 4 °C. Similares resultados obtuvieron Oms et al., 2006, en relación al efecto antipardecimiento sobre la PPO en trozos de pera. El uso del AA o el de 4-HR no consiguieron evitar que las peras recién cortadas se oscurecieran en la superficie. De la misma forma, tratamientos con NAC, GSH y 4-HR conseguían inhibir totalmente la actividad PPO, pero en las muestras tratadas con 0,75% de GSH se producía un incremento de la actividad PPO durante la tercera semana de almacenamiento, a la vez que producían una pérdida de firmeza en las peras recién cortadas, con la consiguiente pérdida de calidad de las mismas.

A la vista de nuestros resultados, y dado que el consumidor apuesta por ingredientes naturales, se podría postular la idea del uso de la estevia como inhibidor del pardecimiento enzimático como alternativa al ácido ascórbico, comúnmente utilizado para evitar el pardecimiento enzimático en frutas, así como a otros agentes antipardecimiento, tales como sulfitos, ácido cítrico, etc..

## **2) Efecto de la aplicación de las HPP sobre la actividad polifenoloxidasas y peroxidasa.**

En la figura 4, se muestran los resultados de la actividad de las enzimas PPO y POD obtenidos tras la aplicación de HPP en la matriz vegetal. Las distintas variables ensayadas han sido: presión (300, 400 y 500 MPa) y tiempo de tratamiento (5, 10 y 15 minutos) en ausencia de estevia. La actividad enzimática se determina antes y después del tratamiento por altas presiones hidrostáticas, permitiendo el cálculo del porcentaje de inhibición conseguido con la aplicación de dicha tecnología.



**FIGURA 4:** Porcentaje de inhibición de las enzimas PPO y POD tras la aplicación de diferentes tratamientos de HPP: 300 y 500 MPa durante 5 y 15 minutos y 400 MPa durante 10 minutos, en ausencia de estevia.

Independientemente de la enzima, a medida que se incrementan los tiempos de tratamiento, dentro de un mismo valor de presión, el porcentaje de inhibición conseguido por esta tecnología es mayor. De igual forma, para un mismo tiempo de tratamiento, valores de presión mayores ejercen un mayor efecto inhibitorio.

En el caso de la PPO los porcentajes de inhibición han oscilado desde el 68,0%, valor medio obtenido con el tiempo y tratamiento ensayado más suave (5 minutos a 300 MPa), a un 97,5% tras 15 minutos a una presión de 500 MPa. Cabe destacar el hecho de que, a partir de los 500 MPa, la variación del porcentaje de inhibición como consecuencia del aumento del tiempo de tratamiento no es tan significativa como en el resto de presiones, lo que nos hace sospechar la existencia de una fracción enzimática barorresistente.

En el caso de la POD, los porcentajes de inhibición han oscilado desde el 41,0%, valor medio obtenido al aplicar 300 MPa durante 5 minutos, a un 94,3%, valor medio obtenido tras 15 minutos a 500 MPa de presión.

De acuerdo con ello, nuestros resultados muestran una mayor inactivación de la enzima PPO. Garcia-Palazón et al., 2004, describió la completa inactivación de la PPO de fresa después de 15 minutos de tratamiento a 600 MPa a temperatura controlada entre 18 y 22 °C. En estas mismas condiciones sólo se consiguió inactivaciones en un rango entre un 11 y un 35% para el caso de la POD. Sin embargo, otras publicaciones muestran que es la PPO más resistente a las altas presiones que la POD. Es el caso de los resultados obtenidos por Terefe et al., 2010, quienes aplicaron la tecnología de HPP en puré de 2 variedades de fresa consiguiendo porcentajes de inactivación de la PPO del 23% frente al 96% de inactivación de la POD, en el tratamiento más adverso utilizado: 90 °C; 690 MPa; 15 minutos. Trabajos realizados en extractos enzimáticos procedentes de piña (Rosenthal et al., 2002) obtienen niveles de inactivación enzimática del 60 y

del 33% para el caso de la POD y de la PPO, respectivamente, en condiciones de 600 MPa, 60 °C y 30 minutos de tratamiento.

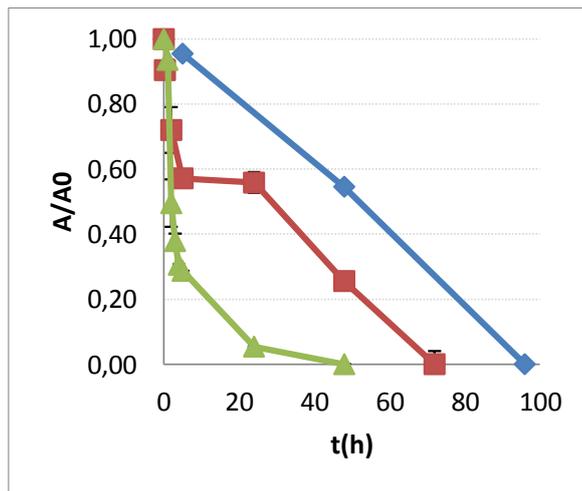
### **3) Efecto combinado de la aplicación de la tecnología de HPP con la adición de *Stevia rebaudiana* sobre la actividad polifenoloxidasas y peroxidasa.**

Tal cual se ha descrito en el apartado 1) para evaluar el efecto de la estevia sobre la actividad enzimática es necesario la incubación de las muestras. Por ello tras el tratamiento por HPP las muestras se incubaron a diferentes temperaturas (12, 24,5 y 37 °C). En consecuencia y dado el elevado número de variables se decidió la aplicación de un diseño centrado compuesto para evaluar el efecto combinado de las HPP con la adición de estevia sobre las actividades POD y PPO con 4 variables independientes: presión y tiempo de tratamiento, concentración de estevia y temperatura de incubación post-tratamiento.

En el caso de la POD, el valor de la actividad estaba por debajo del límite de detección del método tras la aplicación de la tecnología HPP, por lo tanto, no se han podido llevar a cabo incubación de las muestras post-tratamiento, a excepción del tratamiento más suave realizado (300 MPa durante 10 minutos y con una concentración de 1,25% de estevia) en el que tras obtener un 61,1% de inhibición de la enzima con el tratamiento de HPP, ésta se degrada hasta valores inferiores al límite de detección del método tras 3 horas de incubación. Por lo tanto, la enzima POD resulta ser más sensible al efecto combinado entre ambas técnicas, debido, en parte, a su mayor sensibilidad a la estevia, en relación a la PPO.

En el caso de la PPO, la evolución de la enzima con el tiempo de almacenamiento en función de diferentes factores, queda reflejada en las figuras 5 (efecto temperatura), 6 (efecto concentración de estevia), 7 (efecto presión de tratamiento) y 8 (efecto tiempo de tratamiento), en las que se han representado las curvas de degradación obtenidas tras la aplicación de las HPP y después de haber sido almacenadas a distintas temperaturas (12, 24,5 y 37 °C) en presencia de distintas concentraciones de estevia (0, 1,25 y 2,5%).

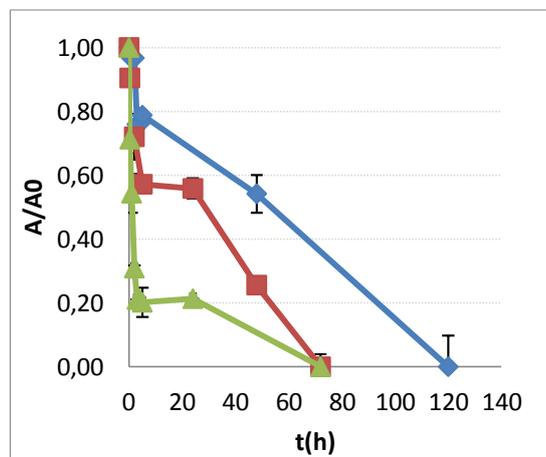
El efecto de la influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad PPO de muestras tratadas por HPP y en presencia de estevia se observa en la figura 5.



**FIGURA 5:** Curvas de degradación de la PPO en función de la temperatura de incubación (12°C♦, 24,5°C■ y 37°C▲) tras un tratamiento de 400 MPa, 10 min y con una concentración de estevia del 1,25%.

Si mantenemos constante la presión, el tiempo de tratamiento y la concentración de estevia y sólo variamos la temperatura de incubación, se observa que a mayor temperatura de incubación, mayor velocidad de degradación, puesto que con una temperatura de 12 °C existe actividad enzimática hasta 4 días después de la incubación, mientras que para 24,5 y a 37 °C la actividad PPO está por debajo del límite de detección del método, tras 72 y 48 horas de incubación, respectivamente. Los resultados concuerdan con los obtenidos en el apartado 1) en muestras sin tratar por HPP.

El efecto de la concentración de estevia sobre la actividad PPO de muestras tratadas por HPP se observa en la figura 6.

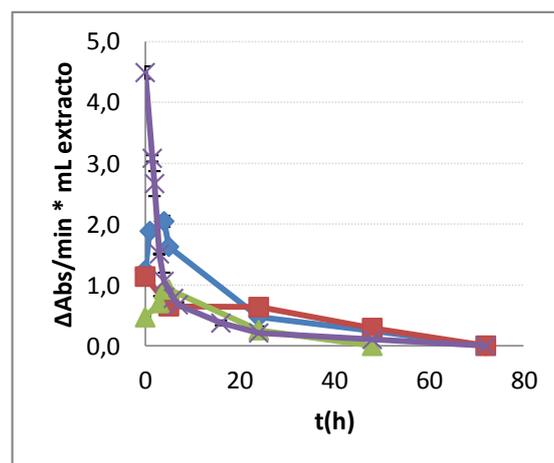


**FIGURA 6:** Curvas de degradación de la PPO a 24,5°C en función de la concentración de estevia (0♦, 1,25■ y 2,5▲ %) tras un tratamiento de 400 MPa durante 10 min.

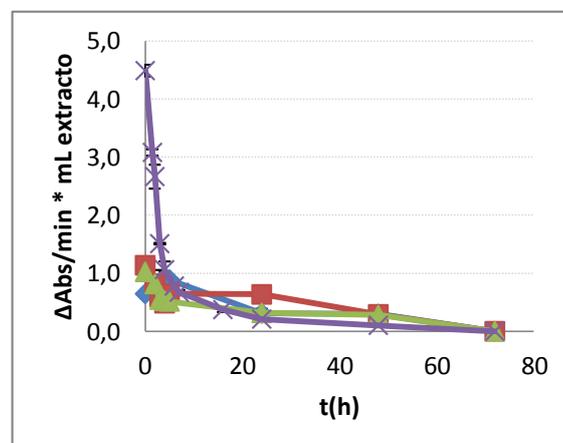
Si mantenemos constante la presión y el tiempo de tratamiento, junto con la temperatura de almacenamiento y sólo variamos la concentración de

estevia, se observa que a mayor concentración de estevia se obtiene una menor actividad enzimática (figura 6). De hecho, tras 48 de incubación post-tratamiento existe un porcentaje de actividad enzimática del 54,2, 25,6 y 12,1%, en las muestras con un 0, 1,25 y un 2,5% de estevia, respectivamente. Del mismo modo otros autores han llevado a cabo estudios combinando diferentes barreras para mejorar la inactivación enzimática. Cabe destacar los realizados combinando HPP y tratamientos térmicos en fresa (Terefe et al., 2010), en fresa y zumo de naranja (Cano et al., 1997), en zanahoria (Soysal et al., 2004) y en batidos de frutas (Keenan et al., 2012), obteniéndose en todos ellos un efecto sinérgico en relación a la inactivación enzimática entre ambas técnicas.

El efecto de la influencia de la presión y del tiempo de tratamiento queda reflejado en las figuras 7 y 8.



**FIGURA 7:** Curvas de degradación de la PPO a 24,5 °C tras un tratamiento de 10 min a 300◆, 400■ y 500▲ MPa en muestras con 1,25% de estevia. Comparación con muestra sin tratar por HPP (X).



**FIGURA 8:** Curvas de degradación de la PPO a 24,5 °C tras un tratamiento de 400 MPa durante 5◆, 10■ y 15▲ min en muestras con 1,25% de estevia. Comparación con una muestra sin tratar (X).

En ambas figuras se observa que a partir de las 5h de incubación todas las muestras se degradan a una velocidad similar independientemente del tratamiento recibido. Sin embargo, la muestra que no ha sido sometida al tratamiento por HPP presenta una mayor velocidad de degradación enzimática durante las primeras 5 horas de incubación. Este fenómeno podría deberse al hecho de que la enzima PPO podría estar constituida por dos fracciones, una lábil (sensible al tratamiento de HPP en presencia de estevia) y que sería la que se degrada durante las primeras horas de incubación, y una estable a las altas presiones, que sería la fracción residual que nos quedaría tras el tratamiento por HPP y de la que estudiamos su degradación post-tratamiento mediante su incubación con el tiempo. De esta manera, los valores absolutos de PPO tras aproximadamente 5 horas de incubación en muestras no sometidas a tratamiento por HPP en las condiciones mostradas, serían equiparables a los obtenidos tras las HPP y que constituyen el valor inicial a partir del cual estudiamos su evolución con el tiempo tras la incubación post-tratamiento. Por lo tanto la combinación de HPP y estevia inactiva lo que parece ser la fracción enzimática lábil. Esta afirmación debería ser confirmada con técnicas moleculares.

## **CONCLUSIONES**

La actividad de las enzimas oxidativas PPO y POD se ve afectada por la temperatura de incubación, de modo que a mayor temperatura la velocidad de degradación enzimática es mayor, siendo la POD más resistente a la degradación.

Del mismo modo, la adición de *Stevia rebaudiana* reduce la actividad de las enzimas PPO y POD, siendo mayor su efecto cuanto mayor es la concentración de estevia. Los resultados muestran que la enzima más resistente a la estevia es la PPO.

Las HPP inactivan un 97% y un 94% la actividad de PPO y POD, respectivamente.

El uso combinado de la tecnología de HPP y *Stevia rebaudiana* es una buena medida para inhibir la actividad POD y reducir la actividad PPO hasta valores por debajo del 97%.

Por todo ello, dada la capacidad antioxidante atribuida a las hojas de *Stevia rebaudiana*, ésta podría ser utilizada como agente antipardecimiento reduciendo la actividad de las enzimas oxidativas, POD y PPO, evitando la pérdida de calidad nutricional y organoléptica de las frutas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Quisiera agradecer al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) la oportunidad que me ha brindado de integrarme en su

departamento donde he podido desarrollar el trabajo asociado a esta Tesina de Máster. Quiero agradecer, a mis directores Dolores Rodrigo Aliaga y Antonio Martínez López, así como a mi tutora experimental María Nieves Criado García, por orientarme durante la realización de este proyecto, gracias por la paciencia y confianza brindadas, así como al resto del equipo del departamento, por su atención y gran ayuda durante el desarrollo de mi Tesina de Máster.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y los ánimos recibidos de mi familia, amigos y Ricardo, así como mis padres y hermano, quienes con esmero y sacrificio día a día han luchado por mi bienestar y formación personal.

A todos ellos, muchas gracias.

## REFERENCIAS

- Acevedo, B.; Montiel, M.; Avanza, J. 2004. Estudio cinético de la degradación de la actividad antioxidante hidrosoluble de jugos cítricos por tratamiento térmico. *Facena*, 20: 91-94.
- Alvarez-Parrilla, E.; de la Rosa, L.A.; Rodrigo, J.; Salazar, K.A.; Escobedo, R.; Mercado, G.; Moyers, E.; Vázquez, A. 2005. Efecto de las ciclodextrinas en la inhibición de la polifenoloxidasas de manzana, como herramienta en la conservación de manzana fresca cortada. Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados" La Habana, Cuba. pp 81-89.
- Alvarez-Parrilla, E.; de la Rosa, L.A.; Rodrigo-García, J.; Escobedo-Gonzalez, R.; Mercado-Mercado, G.; Moyers-Montoya, E.; Vazquez-Flores, A.; Gonzalez-Aguilar, G.A. 2007. Dual effect of beta-cyclodextrin (beta-CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food chemistry*, **101(4)**:1363-1373.
- Atteh, J.O.; Onagbesan, O.M.; Tona, K.; Decuypere, E.; Geuns, J.M.C.; Buyse, J. 2008. Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, *bertoni*) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *J Animal Phys Animal Nutrit*, **92**:640-649.
- Cano, M.P.; Hernández, A.; De Ancos, B. 1997. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, **62(1)**:85-88.
- Chaturvedula, V.S.P.; Upreti, M.; Prakash, I. 2011. Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Molecules*, **16(5)**: 3552-3562.
- Cheikh, N.; Shi-Ying, X.; Zhang, W. 2009. Steam blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (*Mangifera indica* L.) slices. *Food Chemistry*, **113**: 92-95.
- García-Palazón, A.; Suthanthangjai, W.; Kajda, P.; Zabetakis, I.; 2004. The effect of high hydrostatic pressure on B-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Food Chemistry*, **88**: 7-10.
- Giner, J.; Gimeno, V.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martín, O. 2001. Effects of pulsed electric field processing on apple and pear polyphenoloxidases. *Food Sci Tech Int*, **7(4)**:339-345.
- Il-Suk, K.; Yang, M.; Ok-Hwan, L.; Suk-Nam, K. 2011. *Food Science and Tech*. **44(5)**:1328-1332.
- Keenan, D.F.; Rößle, C.; Gormley, R.; Butler, F.; Brunton, N. 2012. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *Food Science and Technology*, **45**: 50-57.
- Lim, Y.Y.; Lim, T.T.; Tee, J.J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits. A comparative study. *Food Chemistry*, **103**:1003-1008.

- McEvily, A. J.; Iyengar, R.; Otwell, W.S. 1992. Inhibition of Enzymatic Browning in Foods and Beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32(3)**: 253-273.
- Murcia, M.A.; Jiménez, A.M.; Martínez-Tomé, M. 2001. Evaluation of the antioxidant properties of mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, **64(12)**: 2037-2046.
- Nagai, T; Suzuki, N. 2001. Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L. *J.Agric. Food Chem.*, **49**: 3922-3926.
- Oms-Oliu, G.; Aguiló-Aguayo, I.; Martín-Belloso, O. 2006. Inhibition of Browning on fresh-cut pear wedges by natural compounds. *Journal of food science*, **71(3)**:S216-224.
- Rapeanu, G.; Van Loey, A.; Smout, C.; Hendrickx, M. 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, **94**:253-261.
- Raso, J.; Barbosa-Cánovas, G. 2003. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 265-285.
- Rodrigo, C.; Rodrigo, M.; Alvarruiz, A.; Frígola, A. 1996. Thermal Inactivation at High Temperatures and Regeneration of Green Asparagus Peroxidase. *Journal of Food Protection*, **59(10)**:1065-1071.
- Rojas-Graü, M.A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. 2008. Effect of natural antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut Fuji apples as an alternative to the use of ascorbic acid. *Journal of Food Science*, **73(6)**:S267-272.
- Rosenthal, A.; Ledward, D.; Defaye, A.; Gilmour, S.; Trinca, L. 2002. Effect of pressure, temperature, time and storage on peroxidase and polyphenoloxidase from pineapple. En: Hayashi, R. (eds.). *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Elsevier Science B.V., 525-532.
- Soysal, Ç.; Söylemez, Z.; Bozoglu, F. 2004. Effect of high hydrostatic pressure and temperature on carrot peroxidase inactivation. *Eur Food Res Technol*, **218**:152-156.
- Tadhani, M.B.; Patel, V.H.; Rema Subhash. 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**:323-329.
- Terefe, N.S.; Hong Yang, Y.; Knoerzer, K.; Buchow, R.; Versteeg, C. 2010. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**:52-60.
- Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81(9)**:853-876.
- Wen, Q; Ma, R; Dong, Q; Xin Y. 2006. Studies on postharvest physiology and the storage technology of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, **30**: 670-683.
- Wölwer-Rieck, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**:886-895.