



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en

Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Influencia de los tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje en la extracción de componentes de interés de las endrinas durante el proceso de elaboración de pacharán

Influence of pulsed electric fields treatments on the extraction of compounds of interest from sloe berries during the elaboration of pacharan

Autor/es

Javier Aguilera Inés

Director/es

Dr. Javier Raso Pueyo
Dr. Guillermo Saldaña Navarro

Facultad de Veterinaria

2017

INDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. El pacharán	6
3.1.1. La endrina y el endrino	6
3.1.2. Compuestos de interés en la endrina	7
3.1.3. Proceso de elaboración del pacharán	7
3.1.3.1. Regulaciones oficiales	8
3.2. Maceración y procesos de transferencia de masa	10
3.2.1. Extracción sólido-líquido o lixiviación	11
3.3. Los pulsos electricos de alto voltaje (PEAV)	12
3.3.1. Fundamento de la técnica	12
3.3.2. Parámetros del proceso	13
3.3.2.1. Intensidad del campo eléctrico	13
3.3.2.2. Tiempo de tratamiento	13
3.3.2.3. Energía por pulso	13
3.3.2.4. Frecuencia	14
3.3.2.5. Resistencia de la cámara de tratamiento	15
3.4. Los pulsos eléctricos en la extracción de componentes	15
4. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	16
5. MATERIAL Y METODOS	17
5.1. Equipo de pulsos electricos de alto voltaje (PEAV)	17
5.2. Las endrinas	18
5.3. Extracción de compuestos de la endrina	19
5.3.1. Estudio de la influencia de la Intensidad del Campo Eléctrico	19
5.3.2. Estudio de la influencia de la duración del tratamiento	20
5.3.4. Elaboración tradicional de pacharán asistido por PEAV	22
5.4. Determinaciones analíticas	23
5.4.1. Intensidad de componente amarilla, roja y azul	23
5.4.2. Índice de Polifenoles Totales	24
5.4.3. Antocianos totales	24
5.5. Modelización matemática de la cinética de extracción	24
5.6. Análisis estadístico de los datos	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1. Efecto de la electroporación de las endrinas en su posterior maceración en una solución de etanol en agua	26
6.2. Influencia de la intensidad del campo eléctrico, de la cantidad de endrinas y del porcentaje de etanol en el medio de maceración en la extracción de componentes de las endrinas	29
6.3. Elaboración tradicional de pacharán con endrinas tratadas por PEAV	35
7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFIA	41

1. RESUMEN

El pacharán es una bebida espirituosa elaborada a partir de la maceración de endrinas en una solución de etanol en agua. En el proceso de maceración se transfieren al medio líquido los principales componentes que caracterizan al pacharán como son los antocianos responsables de su color rojo y los compuestos fenólicos entre otros. La tecnología de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad y corta duración sobre un alimento, produciendo electroporación en las membranas celulares, que favorecen la transferencia de compuestos del interior de las células al medio externo.

En esta investigación, se ha evaluado, por primera vez, el efecto de la electroporación de las endrinas en la extracción de componentes de interés durante el proceso de elaboración del pacharán. Para ello, se han optimizado las condiciones del tratamiento por PEAV (intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento) y las condiciones de maceración de las endrinas (cantidad de endrinas y % de etanol). Una vez establecidas las condiciones óptimas de todos los parámetros investigados se elaboró pacharán siguiendo el método tradicional marcado por la IGP Pacharán Navarro. Para evaluar la extracción de componentes se determinó el índice cromático, la cantidad de antocianos y el índice de polifenoles totales.

Los estudios revelan que en un rango de intensidad de 3 a 5 kV/cm tratamientos de una duración de 51 μ s (17 pulsos de 3 μ s de anchura) permitían conseguir la máxima electroporación de las endrinas. La electroporación de las endrinas afectó a la influencia que la concentración de etanol en el medio de extracción tiene sobre la extracción de compuestos que absorben a una longitud de onda de 520 nm. Cuando las endrinas no se trataron, la Abs_{520} aumentó linealmente al aumentar la concentración de etanol entre 20 y 40%. Sin embargo, cuando se trataron previamente por PEAV el incremento en la concentración de etanol entre 20 y 30% no provocó un aumento significativo en la Abs_{520} del medio de extracción.

Durante el proceso de elaboración tradicional de pacharán utilizando endrinas tratadas por PEAV se observó que tras 8 días de maceración se habían alcanzado los índices cromáticos establecidos por la IGP Pacharán de Navarra y tras 15 días de maceración estos valores eran un 60% superior al máximo marcado por la IGP y

3,8 veces superior al obtenido en el pacharán control, el cual tardó 90 días en alcanzar los índices cromáticos máximos.

En conclusión, La elaboración del pacharán con endrinas tratadas con PEAV podría permitir en un proceso industrial reducir el tiempo de maceración, obtener más cantidad de pacharán con menos cantidad de endrinas o aumentar la cantidad de pacharán obtenido con la misma cantidad de endrinas.

2. **ABSTRACT**

Pacharan is a spirit drink yielded from sloe berries maceration in a solution of ethanol in water. In the maceration process, the main components that characterize the pacharan are transferred to the liquid medium, such as the anthocyanins responsible for their red color and phenolic compounds, among others. The Pulsed Electric Fields (PEF) technology consists of the intermittent application of high intensity and short duration electric fields on a food, producing electroporation in the berry cell membranes, which favor the transfer of compounds from the interior of the cells to the external environment.

In this research, the effect of electroporation in sloe berry membranes and the extraction of components of interest while the pacharan is elaborated, has been evaluated for first time. For this aim, the treatment conditions by PEF (electric field strength and treatment time) and maceration conditions of sloe berries (amount of sloe berries and %vol. of ethanol) have been optimized. Once the optimum conditions of all the investigated parameters were established, pacharán was elaborated following the traditional method marked by the “IGP Pacharán de Navarra”. In order to evaluate the extraction of components, chromatic index, the amount of anthocyanins and the total polyphenol index were determined.

The studies have shown that treatments, in a range of intensity of 3 to 5 kV/cm and a duration of 51 μ s (17 pulses of 3 μ s of width) allowed to obtain the maximum electroporation of the cellular membranes. The electroporation affects the influence that the concentration of ethanol in the extraction medium has on the extraction of compounds that absorb at a wavelength of 520 nm. When the sloe berries were untreated, Abs_{520} increased linearly with the higher of ethanol concentration between 20 and 40%. However, when previously the berries were

treated by PEF, the increase in ethanol concentration between 20 and 30% cause an insignificant increase in the Abs_{520} of the extraction medium.

During the traditional yield of pacharan using PEF treated sloe berries it was observed that after 8 days of maceration, the color indexes established by the “IGP Pacharán de Navarra” had been already reached. After 15 days of maceration these values were 60% higher than the maximum marked by the IGP, and 3.8 times higher than those obtained with the control, which took 90 days to reach the maximum chromatic index.

In conclusion, the elaboration of pacharán with sloes treated with PEAV could allow an industrial process to reduce time of maceration, to obtain more amount of pacharán with less amount of sloes or to increase the amount of pacharán obtained with the same amount of sloe berries.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EL PACHARÁN

El pacharán se define como una bebida espirituosa aromatizada elaborada a partir de la maceración de los arañones, pacharanes o endrinas, denominación del fruto del endrino según procedencia, (*Prunus spinosa* L.) en alcohol etílico, libre de conservantes y aditivos y con claro sabor afrutado. Es un licor tradicional y típico, referenciado documentalmente desde el siglo XV, con un destacable arraigo en el norte de España y más particularmente en Navarra (Consejo Regulador del Pacharán de Navarra, 2003). Se conocen bebidas espirituosas semejantes producidas en otros lugares y elaboradas de manera similar, como el Sloe Gin (Escocia e Inglaterra), el Schlehenfeuer (Alemania), la Prunella (Francia) y el Bargnolino (Italia). No obstante, dichos licores son diferentes del pacharán en lo que se refiere al medio de maceración usado y a sus orígenes (Climent, 2015).

El pacharán se caracteriza, por poseer un atractivo color rojo, el cual proviene de la extracción de antocianos durante la etapa de maceración de las endrinas, de entre los que destaca la punicianina (Girones et al., 2014; Climent et al., 2015). Además, se le atribuye una serie de propiedades terapéuticas, digestivas y diuréticas conferidas por los frutos, los cuales se considera que poseen cualidades purgativas, antioxidantes y anticolinérgicas (Barros et al., 2010; Calvo y Caverro, 2014).

3.1.1. La endrina y el endrino

La endrina, como se ha mencionado anteriormente, es el fruto del endrino (*Prunus spinosa* L.), un arbusto de hoja perenne perteneciente a la familia de las rosáceas (*Rosaceae*), que crece de forma silvestre en zonas escarpadas no cultivadas. Es una planta con amplia distribución en España, más abundante en zonas septentrionales, aunque es descrita y aparece en numerosas zonas de Europa, alcanzando Escocia y el centro de Escandinavia. También se puede observar de forma espontánea en regiones de Argelia y del Cáucaso (Blanca et al., 1998).

3.1.2. Compuestos de interés en la endrina

Aunque la composición fotoquímica de la endrina ha sido poco estudiada, se sabe por diversas investigaciones que destaca la presencia de 4 antocianos, 2 cianidin-glicosidos y 2 peonidin-glicosidos. Además, contiene derivados de la quercetina y kaempferol (heterósidos flavonoles) y derivados del ácido hidrocínamico (ácido-3-cafeoilquicina) (Sokol-Letowska et al., 2014; Ramos y Macheix, 1990; Ganhão et al., 2010; Gironés-Vilaplana et al., 2012). Por otro lado, existe una alta concentración de otros compuestos fenólicos, que tienen función antioxidante (Calvo y Caverio 2014).

Sin embargo, las condiciones de elaboración y almacenamiento afectan de forma notable a la estabilidad de los antocianos, como son las altas temperaturas, presencia de oxígeno, luz, pH y tiempos largos de almacenamiento. Como consecuencia el color del pacharán puede evolucionar del típico color rojizo hacia un color más anaranjado e incluso amarillento (Gironés-Vilaplana, 2015).

3.1.3. Proceso de elaboración del pacharán

Se pueden distinguir varias estrategias en los procesos de elaboración a nivel industrial y doméstico, aunque tienen similitudes entre ambos.

En el proceso de elaboración a nivel industrial (Fig. 3.1a), las endrinas se sumergen en alcohol etílico de origen agrícola de 60% vol. y se dejan macerar durante un tiempo que puede oscilar entre 3 a 8 meses, para extraer la máxima cantidad de color y de compuestos volátiles. En este punto algunos fabricantes corrigen la graduación alcohólica con agua potable reduciéndola hasta 25%, mientras que otros fabricantes la mantienen al 60%. En algunas elaboraciones se añade azúcar tras la etapa de maceración o extracción, pero existe la posibilidad de añadirlo previamente a esa etapa. Además, junto a los azúcares, se añade anís verde, (*Pimpinella anisum* L.) y/o anís estrellado, (*Illicium verum* H.), mediante el uso de aceites esenciales de estos anises. El licor resultante se decanta y se filtra. La graduación alcohólica final de la bebida se fija en 25% y 30% vol. para lo cual se suele diluir la mezcla con agua potable (Fernández-García et al., 1998; Real Decreto 164/2014 de 14 de marzo; Expediente Técnico de la Indicación Geográfica Protegida Pacharán Navarro, 2015).

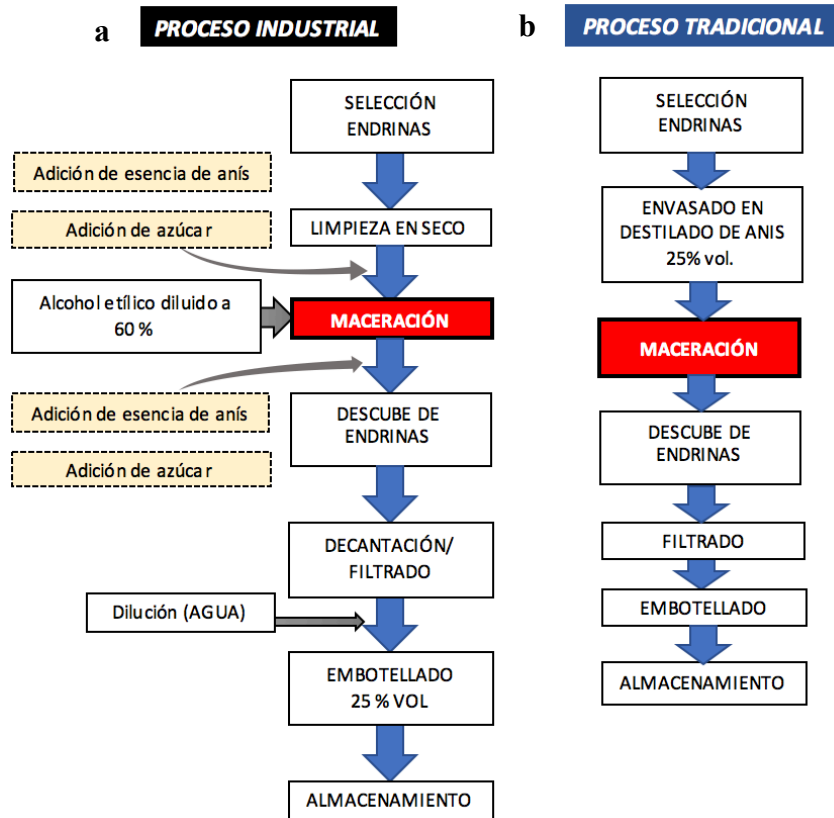


Fig. 3.1 Diagrama de Flujo elaboración del Pacharán en la Industria (a) y tradicional (b)

A nivel doméstico, existen distintas elaboraciones, pero en líneas generales se trata de una maceración de los frutos en licor de anís de 25% vol. de grado alcohólico directamente en botella de vidrio (Fig. 3.1b). En algunas elaboraciones domesticas se añaden granos de café, cortezas de limón, canela u otros condimentos, que aportan sabor y aroma que se extrae durante la maceración con el anís. En estas condiciones se suelen dejar los frutos en maceración durante un período que oscila entre tres y seis meses (García-Bona, 1981).

3.1.3.1. Regulaciones oficiales

El Consejo Regulador del Pacharán Navarro es el único organismo oficial existente encargado de regular y fijar las condiciones de elaboración y de embotellado de Pacharán Navarro. Además, determina los requisitos de calidad necesarios para que el producto pueda acogerse a la Indicación Geográfica Protegida (IGP).

El Expediente Técnico de la IGP establece una serie de requisitos y condiciones para el pacharán, entre ellos se determina que el grado alcohólico del producto final debe estar comprendido entre 25% vol. y 30% vol. Por otro lado, la cantidad de azúcar total

debe ser de un mínimo de 80 y de un máximo de 250 g/L expresado en gramos de sacarosa (producto final) (tabla 3.1).

En cuanto a los parámetros de calidad (tabla 3.1), el Expediente Técnico de la IGP, especifica que el color del pacharán debe ser rojo granate cereza con tonalidades violetas de intensidad alta y muy brillante. Se establece que la evaluación se haga midiendo la intensidad de color (IC), a través de técnicas de análisis espectrofotométricas a 3 longitudes de onda; 420 nm, 520 nm y 620 nm, debiendo presentar valores de absorbancia medidos en unidades de absorbancia (UA) comprendidos, entre 0,50 – 1,20; 0,40 – 0,96 y 0,05 – 0,20 respectivamente, en el producto terminado. Finalmente, se especifica que la turbidez deberá ser igual o menor de 10 unidades de turbidez nefelometría (NTU).

Tabla 3.1: Parámetros pacharán terminado especificados por el Expediente Técnico de la IGP Pacharán de Navarra.

Grado alcohólico	25-30% vol.
Azúcares totales	80-250 g/L
Color	Rojo granate cereza con tonalidades violetas intensos y muy brillantes
Absorbancia 420	0,50 – 1,20
Absorbancia 520	0,40 – 0,96
Absorbancia 620	0,05 – 0,20
Turbidez	10 NTU

En cuanto a las características específicas del Pacharán Navarro elaborado, la Instrucción Técnica establece que únicamente se puede emplear anís verde y estrellado, sin especificar cantidad ni modo de incorporación. La cantidad de endrinas a utilizar será, entre 150-300 gr/L, éstas deben ser de primera calidad en maduración y textura. Antes de ser introducidas en los recipientes de maceración estarán exentas de cualquier impureza. El tiempo de maceración durará entre 1 y 8 meses, no permitiéndose añadir endrinas en los envases finales, ni la reutilización de endrinas en su totalidad para una 2ª maceración. Antes del embotellado, el pacharán obligatoriamente será filtrado (Expediente Técnico IGP Pacharán Navarro, 2015).

3.2. MACERACIÓN Y PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE MASA

La extracción de componentes intracelulares es un proceso de transferencia de masa en el que un determinado componente presente en una fase es liberado a una segunda fase como consecuencia de un gradiente de presión o concentración entre ellas, con el objetivo final de la obtención de una determinada sustancia. La velocidad de extracción depende del gradiente entre las fases y de la resistencia que encuentran las moléculas para migrar de una fase a la otra (Aguilera y Stanley, 1999). Esta resistencia depende, fundamentalmente, de las características del medio a través del cual el componente se transfiere, así como de cualquier tipo de interacción entre el componente y el propio medio. Generalmente, la industria alimentaria requiere que la velocidad de la transferencia de masa sea lo más alta posible con objeto de acelerar el proceso de extracción. Ello aumenta la productividad y minimiza la pérdida de calidad del alimento o de la sustancia que se transfiere. En muchos casos, la sustancia de interés se encuentra en el interior celular por lo que es necesario que atraviese las envolturas celulares para su obtención. Estas envolturas dificultan enormemente los fenómenos de transferencia de masa, es por ello que, cuando estas envolturas se desnaturalizan o permeabilizan, la resistencia que ofrecen las membranas celulares al paso de solutos disminuye drásticamente. Para incrementar la permeabilidad de las membranas celulares, en algunos procesos industriales, los tejidos se suelen someter a un tratamiento térmico o enzimático previo (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997; Sacchi et al., 2005). La aplicación de estos tratamientos presenta algunos inconvenientes, como un mayor coste energético del proceso o una liberación de sustancias indeseables al líquido de extracción si la desnaturalización de las paredes celulares es muy intensa (Eshtiaghi y Knorr, 2002; Bouzrara y Vorobiev, 2000). Además, la termosensibilidad de algunas de las sustancias limita la aplicación del calor para mejorar la extracción (Cacace y Mazza, 2003).

Son muy diversos los procesos de transferencia de masa que se producen en la industria alimentaria como la deshidratación, la extracción por presión, el curado y marinado, etc.; siendo uno de los más típicos la extracción sólido-líquido o lixiviación.

3.2.1. Extracción sólido-líquido o lixiviación

El paso de componentes que generalmente se encuentran en el interior de las células de una matriz sólida a un solvente acuoso u orgánico es un fenómeno de transferencia de masa que se conoce con el nombre de extracción sólido-líquido o lixiviación. En este proceso, el solvente se mezcla íntimamente con el sólido y el contacto se mantiene durante el tiempo requerido para que se alcance un equilibrio entre el medio de extracción y el medio sólido. Transcurrido este tiempo, la mezcla se divide en dos partes: una líquida compuesta por la disolución del soluto en el disolvente y otra formada por el residuo constituida por los componentes sólidos insolubles.

Entre los factores que influyen en la velocidad de extracción se encuentran el tamaño de partícula de la matriz sólida, el gradiente de concentración, la temperatura o la velocidad de flujo del disolvente. Algunos productos vegetales se cortan o pican a fin de reducir el tamaño de partícula y favorecer los procesos de extracción, aunque en algunos procesos como en la elaboración de vino o pacharán este paso no es posible. En algunos casos se aumenta la temperatura del solvente para aumentar la velocidad y el rendimiento del proceso de extracción. Sin embargo, algunos productos requieren que la temperatura no sobrepase un determinado valor ya que se podría ver afectada su calidad.

En las últimas décadas ha surgido un gran interés por la mejora de los procesos de transferencia de masa. El objetivo es conseguir acelerar el proceso afectando lo menos posible a las propiedades de las matrices alimenticias. Entre las tecnologías propuestas para conseguir este propósito, se puede destacar el calentamiento mediante microondas, los ultrasonidos, el uso de fluidos supercríticos y los pulsos eléctricos de alto voltaje (Bouzzara y Vorobiev, 2003; Raso y Heinz, 2006; Kazazi et al., 2007; Yu et al., 2007; Vilkhue et al., 2007).

Los PEAV pueden aplicarse para la extracción de muchos compuestos de interés de vegetales. Recientemente se ha estudiado su uso para la obtención de polifenoles de diversas matrices como granos de uva (Corrales et al., 2008; López et al., 2008; Boussetta et al., 2012), de hojas de borraja (Segovia et al., 2015), de patata morada (Puertolas et al., 2013), de naranja pelada (Luengo et al., 2013) entre otras.

3.3. LOS PULSOS ELECTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV)

3.3.1. Fundamento de la técnica

La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), es una técnica no térmica, que consiste en la aplicación de pulsos de corta duración (de milisegundos a nanosegundos) de campos eléctricos de alta intensidad (kV/cm) (Luengo, 2016). Los pulsos eléctricos se aplican sobre el producto mediante dos electrodos que confinan al alimento en una cámara de tratamiento (Gongora-Nieto, 2002). La estructura celular que se ve afectada principalmente por la acción de un campo eléctrico externo es la membrana lipídica.

La membrana celular, como es ampliamente conocido es una barrera semipermeable compuesta por una bicapa de fosfolípidos. Cuando ésta es sometida a un campo eléctrico externo mayor al nativo, cambia la conformación eléctrica produciéndose una reorganización de los fosfolípidos de la membrana, este fenómeno es conocido como electroporación y puede ser causa de colapso de la membrana celular (Baier, 2015). Por otro lado, la membrana también puede perder su integridad por la electrocompresión que se produce al aplicar el pulso eléctrico externo y al cambiar las cargas eléctricas de la membrana, electrolitos como el Ca^{2+} , Na^+ o K^+ se acumulan a ambos lados de la membrana generando un diferencial de potencial a través de la misma, estas cargas se atraen unas sobre las otras, provocando una compresión en la membrana haciéndose más fina. La elasticidad de membrana contrarresta la presión, pero si se supera el punto de elasticidad se produce un poro (Calderón-Miranda, 1998). De acuerdo con la intensidad del campo eléctrico aplicado, el número de pulsos, la duración y la temperatura, la electroporación puede ser reversible o no (García, 2007). La aparición de estos poros favorece la salida de los compuestos de interés.

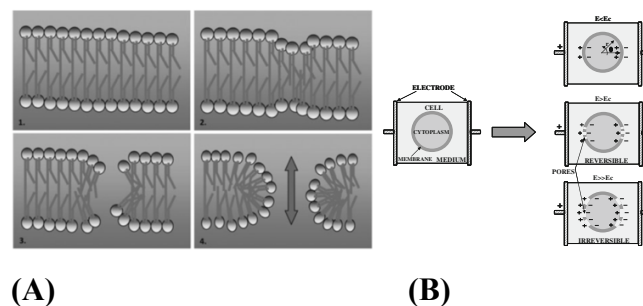


Figura 3.2 Esquema del proceso de electroporación. Formación de poros hidrofílicos (A). Electroporación reversible e irreversible (B). (Donsi, 2010)

3.3.2. Parámetros del proceso

Los parámetros más importantes que caracterizan el tratamiento por PEAV son la intensidad del campo eléctrico, la forma y anchura de pulso, el tiempo de tratamiento, la energía específica aplicada, la frecuencia y la resistencia de la cámara de tratamiento.

3.3.2.1. Intensidad del campo eléctrico

Los pulsos se aplican a una intensidad del campo eléctrico que puede variar según el propósito del tratamiento (0,1-100 kV/cm).

En cámaras de electrodos paralelos, el campo eléctrico se puede definir como la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos donde se coloca la matriz dividida por la distancia existente entre ellos (d), y se puede considerar uniforme:

$$E= V/d \qquad \qquad \qquad \text{(Ecuación 3.1)}$$

Sin embargo, en cámaras colineales o coaxiales, la distribución del campo eléctrico no es homogénea, dependiendo el valor de la intensidad del campo eléctrico en un punto de la cámara del voltaje aplicado entre los electrodos y de su posición (Álvarez et al., 2006).

3.3.2.2. Tiempo de tratamiento

El tiempo de tratamiento se define como el tiempo total efectivo durante el cual se aplica el campo eléctrico. Se calcula multiplicando el número de pulsos aplicados por la anchura o duración del pulso. La anchura del pulso varía desde 1 nanosegundo a 1 segundo y en función de esta variable, se han dividido los tratamientos con PEAV en tratamientos de nanosegundos, microsegundos y milisegundos (Puértolas, 2010).

3.3.2.3. Energía por pulso

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de la cámara de tratamiento, se genera una corriente eléctrica que circula a través del producto. Para mantener esta diferencia de potencial hace falta aplicar energía eléctrica. La forma más

común de calcular la energía de cada pulso (W) aplicada en el producto durante un tratamiento de pulsos es mediante las siguientes ecuaciones:

$$W = V \cdot I \cdot \tau \cdot 1/2 \quad \text{Para pulsos de caída exponencial} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$W = V \cdot I \cdot \tau \quad \text{Para pulsos de onda cuadrada} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

donde V es la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de la cámara de tratamiento (V); τ es la anchura del pulso (s); I es la intensidad de la corriente (A).

La energía eléctrica total aplicada durante un tratamiento de PEAV es igual a la energía por pulso (W) multiplicada por el número total de pulsos (n). La energía por unidad de masa o energía específica (W'), se calcula a partir de la energía total aplicada y de la masa de producto procesado (m), expresándose generalmente en kJ/kg:

$$W' = W \cdot n / m \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Esta energía específica depende del voltaje y de la intensidad de la corriente, del número de pulsos y de su anchura, y de la conductividad y la masa del alimento. Toda la información aportada por este parámetro hace que la energía específica junto con la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento sean los parámetros recomendados a indicar para caracterizar los tratamientos de PEAV (Puértolas, 2010).

3.3.2.4. Frecuencia

La frecuencia se corresponde con el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo. La frecuencia utilizada por los equipos de generación de PEAV es muy variable, pudiendo oscilar entre 1 y 5000 Hz. En las cámaras estáticas, una vez establecido el tiempo efectivo de tratamiento (número de pulsos por su anchura), la frecuencia de los pulsos determina el tiempo de permanencia del producto en la cámara, es decir, el tiempo de procesado. En los tratamientos aplicados en condiciones de flujo continuo, la frecuencia seleccionada junto con el caudal del producto determina el tiempo efectivo de tratamiento del producto (Puértolas, 2010).

3.3.2.5. Resistencia de la cámara de tratamiento

La resistencia de la cámara de tratamiento influye sobre la intensidad de corriente que atraviesa el producto y, por lo tanto, la energía necesaria para generar la diferencia de potencial requerida. La resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento depende de sus dimensiones geométricas y de la conductividad del medio de tratamiento. Cuanto mayor es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento, menor es la resistencia de la cámara de tratamiento, y mayor la energía eléctrica que circula a través de ella, para una diferencia de potencial determinada (Raso et al., 2016)

3.4. LOS PULSOS ELÉCTRICOS EN LA EXTRACCIÓN DE COMPONENTES

Los últimos 50 años, la tecnología PEAV se ha investigado como un tratamiento no térmico con el objetivo principal de la inactivación microbiana (Cregenzán-Alberti et al., 2015; Qi-Xing et al., 2017). Los estudios recientes se han centrado en la permeabilización de las membranas celulares, con el objetivo de mejorar la transferencia de masa de sustancias contenidas en el interior de las células (Luengo et al., 2016). En este caso, la intensidad del campo eléctrico necesario para provocar la electroporación en células eucariotas (principalmente vegetales) es menor que en la aplicación de PEAV para la inactivación microbiana, por lo que se requiere menor aporte energético. La mejora de los procesos de transferencia de masa puede ser utilizada para incrementar la velocidad y el rendimiento de extracción de compuestos de interés como antioxidantes, colorantes o flavonoides (Donsi et al., 2010).

4. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El proceso de elaboración de pacharán se basa en la extracción de componentes presentes en el interior de las células de las endrinas. Este proceso de extracción sólido-líquido, o maceración, es un proceso lento que puede durar entre 3 y 8 meses. La reducción de los tiempos de maceración supone un ahorro de costes y recursos de gran interés en las industrias alimentarias en general, y para los productores de pacharán en particular. La aplicación de nuevas tecnologías, como los PEAV, permitiría optimizar los procesos de maceración aumentando la velocidad de extracción y/o obteniendo una mayor concentración del compuesto de interés.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el potencial de la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje para mejorar el proceso de maceración en la elaboración de pacharán, bien reduciendo el tiempo de maceración, bien aumentando el rendimiento del proceso.

Para ello, se realizaron las siguientes actividades:

- Detección de los parámetros del proceso de PEAV que influyen en el proceso de extracción de componentes de interés de las endrinas.
- Determinación de la influencia de la intensidad del campo eléctrico, concentración de etanol y cantidad de endrinas utilizadas en el proceso de extracción asistido por PEAV.
- Validación de la influencia de los procesos de PEAV en el proceso tradicional de elaboración de pacharán.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. EQUIPO DE PULSOS ELECTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV)

Los tratamientos se aplicaron mediante un equipo de pulsos eléctricos comercial, modelo EPULSUS®-PM1-10 (Energy Pulse System, Lisbon, Portugal). Se trata de un generador Marx de pulsos eléctricos de onda cuadrada de 10 kV de voltaje máximo, 180 A de corriente máxima permitida y 3,5 kW de potencia. Es un equipo compacto, de 800×600×400 mm de dimensiones y 80 kg de peso. El equipo se maneja mediante una pantalla táctil en la que se pueden modificar el voltaje aplicado (hasta 10 kV), la anchura del pulso (de 5 a 100 μ s) y la frecuencia de aplicación (hasta 200 Hz).

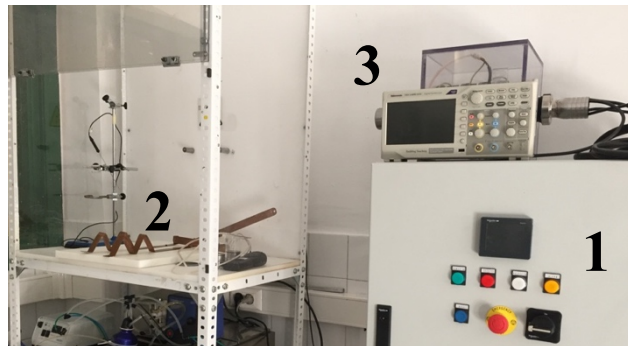


Fig. 5.1. Equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) de onda cuadrada.
(1) Generador de pulsos (2) Zona de tratamiento (3) Osciloscopio

El generador de pulsos se basa en la descarga de unos condensadores desde un generador de tipo Marx, cuyo circuito simplificado se muestra en la figura 5.2.

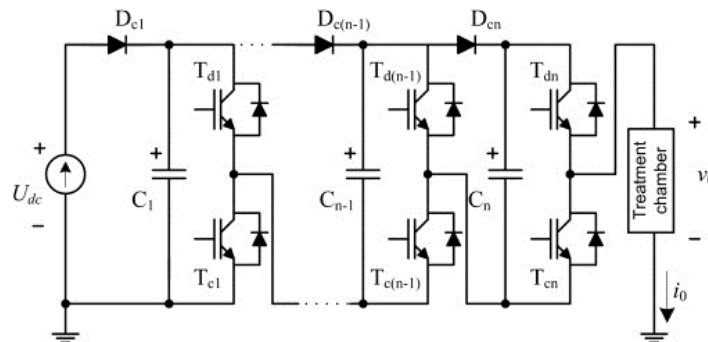


Fig. 5.2 Circuito simplificado del generador de pulsos eléctricos basado en la tecnología Marx usados en este trabajo

El generador se conectó a una cámara cerrada de tratamiento de electrodos paralelos de 80 mm de diámetro y 20 mm de separación entre electrodos, conectando uno de los electrodos al polo positivo y otro a tierra, como se muestra en la figura 5.3. La cámara de tratamiento se llenó con las endrinas y una disolución de agua con NaCl con una

conductividad eléctrica de 1,0 mS/cm ajustada con conductivímetro (mod. 524, Crison Instruments, S.A. Barcelona, España), como líquido conductor. Se eliminaron las burbujas para evitar la formación de arcos eléctricos. La configuración de electrodos paralelos hace que la distribución del campo eléctrico sea homogénea, por lo que es la configuración idónea para el estudio de la influencia de los parámetros del proceso.



Fig. 5.3 Cámara de tratamiento con endrinas conectado a los electrodos

5.2. LAS ENDRINAS

Para la realización de este Trabajo Fin de Master, se utilizó endrinas (*Prunus spinosa* L.) procedentes de parcelas pertenecientes a la Sociedad Cooperativa Los Remedios, ubicada en Sesma (Navarra), sociedad que suministra materia prima a muchos de los productores inscritos en la IGP Pacharán Navarro. Dichas endrinas fueron recogidas en el mes de noviembre, perteneciendo a la última remesa recolectada. El estado de maduración de los frutos era óptimo y el peso medio no excedió de 3 g por baya. Las endrinas fueron acondicionadas, retirando las hojas, ramas y cualquier tipo de ejemplar que presentase algún tipo de deficiencia, como picaduras, deshidratación o presencia de moho, a fin de homogenizar el estado de las endrinas. Las endrinas fueron almacenadas en refrigeración (4°C) hasta su uso (Fig. 5.4).



Fig. 5.4 Endrinas objeto de estudio

5.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE LA ENDRINA

Para la realización de los estudios planteados en el trabajo, se utilizaron dos tipos de medios de extracción de componentes, alcohol etílico y anís de 25% vol. en etanol. En los casos en que se estudiaron los parámetros de tratamiento PEAV, intensidad del campo eléctrico (E) y duración del tratamiento con PEAV (número de pulsos por la anchura o duración de los mismos), se utilizó alcohol etílico a diferentes % vol. A su vez, también se utilizó este medio de extracción en el diseño experimental para optimizar las condiciones del proceso. Posteriormente, en los estudios de validación de la influencia de los procesos de PEAV en la elaboración de pacharán se empleó anís de 25 % vol. etanol.

En todos los casos se utilizaron endrinas tratadas con PEAV en diferentes condiciones y endrinas no tratadas a modo de control, que sirvieron para evaluar el potencial de los PEAV durante la etapa de maceración y su influencia en los parámetros de calidad del pacharán. Todos los procesos se realizaron al menos por duplicado.

Durante la fase de maceración, el tiempo de extracción de componentes, los recipientes que contenían las endrinas con el medio extractivo, se agitaron una vez al día para favorecer el proceso de maceración. Posteriormente se tomaron muestras de 1 mL que se centrifugaron (8640xG, 90 segundos) en microtubos de 1 mL de capacidad (Minispin®plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para eliminar los sólidos en suspensión. Tras centrifugar, se realizaron las determinaciones analíticas correspondientes a cada experimento, que consistieron en efectuar medidas espectrofotométricas con un espectrofotómetro Unicam UV500 (Unicam, Cambridge, Inglaterra) a diferentes longitudes de onda, utilizando cubetas de cuarzo para las medidas en espectro UV (Hellma, Nüllheim, Alemania) de 1 y 2 mm de paso óptico o de plástico para las medidas en el espectro visible (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) de 10 mm de paso óptico.

5.3.1. Estudio de la influencia de la Intensidad del Campo Eléctrico

Como se ha mencionado anteriormente (ecuación 3.1), la intensidad de campo eléctrico (E) se calcula multiplicando la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos por la distancia existente entre ellos (d). Para explorar la intensidad del

campo eléctrico (E), se realizaron 3 tratamientos PEAV con 3 campos eléctricos distintos de 1, 3 y 5 kV/cm a 1 Hz de frecuencia y aplicando 33 pulsos de una anchura de 3 μ s cada uno, por lo que el tiempo de tratamiento total fue el mismo para todas las intensidades de campo eléctrico aplicadas. De cada tratamiento se introdujeron 150 g de endrinas en Erlenmeyer con 33% vol. y con 96% vol. en etanol, en ambos casos por duplicado. Se realizó mismo procedimiento con endrinas sin tratar a modo de control. Durante la maceración se tomaron muestras hasta los 16 días. Posteriormente se realizaron determinaciones de IC e IPT por técnicas espectrofotométricas.

Tabla 5.1: Parámetros utilizados en el estudio de la influencia de la intensidad del campo eléctrico

Campo Eléctrico (kV/cm)	Nº de Pulsos	Frecuencia pulso (Hz)	Anchura pulso (μs)	Cantidad endrinas (g)	Alcohol (% vol.)
0	-	-	-	150	33
0	-	-	-	150	96
1	33	1	3	150	33
1	33	1	3	150	96
3	33	1	3	150	33
3	33	1	3	150	96
5	33	1	3	150	33
5	33	1	3	150	96

5.3.2. Estudio de la influencia de la duración del tratamiento

Para determinar la influencia del tiempo de tratamiento en la electroporación de las células de las endrinas se aplicaron tratamientos de PEAV con una intensidad de campo eléctrico (E) fija de 3 kV/cm y 1 Hz de frecuencia, a diferentes tiempos de tratamiento. Se aplicaron 8, 17, 34, 67, 100 pulsos con una anchura de 3 μ s por pulso, resultando tratamientos con una duración de 24, 50, 100, 200, 300 μ s respectivamente. De cada tratamiento, se tomaron 150 g de endrinas y se introdujeron en diferentes Erlenmeyers. El medio de extracción fue alcohol etílico de 33% vol., y se trabajó por duplicado. A modo comparativo, se repitió el proceso en las mismas condiciones con endrinas no tratadas (tabla 5.2). Se recogieron muestras por el procedimiento ya descrito durante 4 días de maceración. Posteriormente las muestras se centrifugaron y se efectuaron las correspondientes medidas espectrofotométricas de Intensidad de Color (IC).

Tabla 5.2: Parámetros utilizados en el estudio de la influencia de la intensidad del campo eléctrico

Campo Eléctrico (kV/cm)	Frecuencia pulso (Hz)	Nº de Pulsos	Anchura pulso (µs)	Duración tratamiento (µs)	Cantidad endrinas (g)	Alcohol (% vol.)
0	-	-	-	-	150	33
3	1	8	3	24	150	33
3	1	17	3	50	150	33
3	1	34	3	100	150	33
3	1	67	3	200	150	33
3	1	100	3	300	150	33

5.3.3. Optimización de las condiciones de tratamiento

Con objeto de determinar la influencia de la intensidad del campo eléctrico, la concentración de etanol en el medio de extracción y la cantidad de endrinas en la velocidad y el rendimiento del proceso de extracción, se realizaron combinaciones de estos parámetros mediante el diseño experimental que se muestra en la tabla 5.3. Además de las condiciones de tratamiento establecidas para el diseño experimental, se realizaron maceraciones de endrinas no tratadas a modo comparativo.

Se tomaron muestras del medio de extracción durante el periodo de maceración y se determinaron los valores de IC, IPT y antocianos totales mediante espectrofotometría, como se describe en el apartado 5.4. Con los valores obtenidos se elaboraron curvas de extracción y se realizaron modelos matemáticos con los resultados obtenidos (StatEase). Los datos de las curvas control (con endrinas no tratadas por PEAV) no se incluyeron en los modelos matemáticos.

Tabla 5.3 Combinaciones de las variables en el diseño experimental

Nº Muestra	Campo eléctrico aplicado (kV/cm)	% vol. etanol	Concentración de endrinas (g/100g)
1	0	20	10
2	0	20	20
3	0	20	30
4	0	30	10
5	0	30	20
6	0	30	30
7	0	40	10
8	0	40	20
9	0	40	30
10	1	20	10
11	1	20	30
12	1	30	20
13	1	40	10
14	1	40	30
15	3	20	20
16	3	30	10
17	3	30	20
18	3	30	30
19	3	40	20
20	5	20	10
21	5	20	30
22	5	30	20
23	5	40	10
24	5	40	30

Las muestras de la 1 a la 9 corresponden con endrinas no tratadas (control) y no forman parte del diseño experimental. Se incluyeron como referencia para poder realizar comparaciones.

5.3.4. Elaboración tradicional de pacharán asistido por PEAV

Las endrinas fueron tratadas con PEAV en una cámara estática, descrita en el apartado 5.1. Las endrinas tratadas se introdujeron en botellas con anís 25% vol. con dos concentraciones distintas de 150 g/L y 300 g/L. Además, se repitió el procedimiento con endrinas no tratadas a fin de comparar la extracción de polifenoles de las endrinas durante la maceración el proceso de elaboración de pacharán tradicional y el proceso con tratamiento de PEAV. De esta manera se trabajó con 4

elaboraciones con distintas características, cada elaboración se realizó por sextuplicado.

Se tomaron muestras siguiendo el procedimiento descrito en los apartados anteriores durante 170 días de maceración. De las muestras obtenidas se realizaron las determinaciones espectrofotométricas de IC, IPT y, antocianos totales.

Cuando el valor de absorbancia a 520 nm fue igual o superior al marcado por el IGP Pacharán de Navarra (tabla 3.1), se retiraron las endrinas tanto de la preparación con endrinas tratadas por PEAV como de las endrinas no tratadas, a la misma concentración de endrinas por litro de anís y por duplicado. De este modo se establecieron 3 tiempos de maceración distintos:

- Tiempo mínimo para que las endrinas tratadas por PEAV alcancen o superen los niveles de absorbancia a 520 marcados por la IGP Pacharán de Navarra.
- Tiempo mínimo para que las endrinas no tratadas alcancen o superen los niveles de absorbancia a 520 marcados por la IGP Pacharán de Navarra.
- Tiempo mínimo de maceración para alcanzar el equilibrio en la extracción de polifenoles de todas las preparaciones de endrinas.

5.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.4.1. Intensidad de componente amarilla, roja y azul

La intensidad de color (IC) se determinó según el método de Glories (Glories, 1984; Burin, 2010), a partir de la determinación de las absorbancias a 420 nm (componente amarilla), 520 nm (componente roja) y 620 nm (componente azul) del pacharán sin diluir en cubetas de 1mm de paso óptico, y de la ecuación 4.2. Se realizó blanco con etanol a 33% de vol. o anís a 25% vol. según el medio de extracción empleado. Los valores obtenidos para cada absorbancia (A_{420} , A_{520} , A_{620}), se expresaron en UA, con 3 cifras decimales.

$$IC = A_{420} \times A_{520} \times A_{620} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

5.4.2. Índice de Polifenoles Totales

Este índice se basa en la lectura de la absorbancia a 280 nm del pacharán diluido 100 veces con agua destilada, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Se realizó un blanco con etanol o anís, a la concentración correspondiente. El valor de IPT se obtiene multiplicando la absorbancia obtenida (A_{520}) por el factor de dilución (f), tal y como se indica en la ecuación 4.3.

$$\text{IPT} = A_{520} \times f \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

5.4.3. Antocianos totales

El contenido en antocianos totales se determinó por el método de Puissant-León (Ruiz-Hernández, 2004). Para ello, se mezcló pacharán diluido en agua destilada (1/10) en una proporción 1/10 con ácido clorhídrico al 1 %. A continuación, se midió la absorbancia a 520 nm de dicha mezcla en una cubeta de 10 mm de paso óptico, tras realizar un blanco con ácido clorhídrico al 1 %. El valor Antocianos totales se obtiene multiplicando la absorbancia obtenida (A) por el factor de dilución (f) tal y como indica la ecuación 4.4.

$$\text{Antocianos Totales} = A_{520} \times f \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

5.5. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Con objeto de comparar la influencia de los diferentes parámetros del proceso de extracción, se obtuvieron ecuaciones matemáticas que se ajustaron a los datos experimentales de las diferentes curvas de extracción utilizando como modelo matemático la ecuación de Fick, basada en una cinética de primer orden (ecuación 4.5). Esta ecuación ha sido empleada por diversos autores para describir los procesos de extracción sólido-líquido de diferentes componentes intracelulares (Pinelo et al., 2006; Guerrero et al., 2008).

$$Y_t = Y_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

donde Y_t es la concentración del componente extraído, según proceda, tras un tiempo t de maceración (expresado en minutos); Y_{\max} es la concentración máxima del

componente extraído una vez alcanzado el equilibrio; k es la constante que determina la velocidad de difusión (min^{-1}). El ajuste del modelo a los valores de las curvas obtenidas experimentalmente, los cálculos del error estándar de la media y los análisis de varianza ($p=0,05$), se realizaron con el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los análisis estadísticos, así como los ajustes de los modelos, fueron llevados a cabo con el programa informático Excel XP (Microsoft Corporation, Seattle, EE.UU.), el software Design-Expert (Stat-Ease, Mineapolis, EE.UU.) y el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., San Diego, EE.UU.).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mejora de la extracción de componentes de matrices alimentarias ha sido investigada por diversos autores (López et al., 2009, Loginova et al., 2011, Luengo et al., 2016). En estos estudios se ha trabajado con distintas matrices alimentarias, sin embargo, se desconocen referencias previas donde se haya estudiado el uso y efecto de tecnologías que mejoren el proceso de extracción de componentes intracelulares del fruto del endrino para la mejora de elaboración del pacharán. En este trabajo se han analizado los principales parámetros relacionados con la calidad del pacharán, como son su color y la concentración de polifenoles y de antocianos, tras la maceración de las endrina tratadas y no tratadas por PEAV, en soluciones de etanol y anís comercial.

6.1. EFECTO DE LA ELECTROPORACIÓN DE LAS ENDRINAS EN SU POSTERIOR MACERACIÓN EN UNA SOLUCIÓN DE ETANOL EN AGUA.

Con objeto de evaluar si un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) podría resultar beneficioso en el proceso de elaboración de pacharán, se realizó una primera exploración para comprobar si este tratamiento era capaz de electroporar las células de las endrinas y como consecuencia, mejorar la extracción de los componentes intracelulares durante su posterior maceración en una solución de etanol en agua.

La **figura 6.1**, compara la intensidad de color rojo medida como Abs_{520} de una solución acuosa de etanol (33%) que contenía endrinas sin tratar y tratadas por PEAV de distinta intensidad y una duración de 99 μ s durante 4 días de maceración. Los mayores valores de Abs_{520} de las muestras que contenían endrinas tratadas por PEAV, indicaban que el tratamiento era capaz de electroporar las células de las endrinas y facilitar la extracción de los antocianos (principales componentes de las endrinas responsables del color rojo). La efectividad con la que el tratamiento de PEAV incrementó la permeabilidad de la membrana citoplasmática al paso de estos componentes, dependía de la intensidad del campo eléctrico aplicado. Mientras que apenas había diferencias entre la muestra control y la que contenía endrinas tratadas a 1 kV/cm, las muestras que contenían endrinas tratadas a 3 y 5 kV/cm tenían entre 2,33

y 3,16 veces más intensidad de color y contenido en polifenoles que las muestras control.

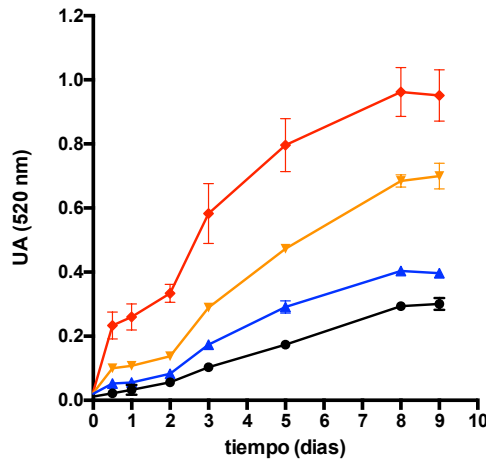


Figura 6.1 Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la extracción de componentes que absorben a 520 nm de las endrinas. Tiempo de tratamiento 99 μ s (33 pulsos de 3 μ s): ● NT, control; ▲ 1 kV/cm; ▼ 3 kV/cm; ◆ 5 kV/cm.

Es bien sabido que para provocar la electroporación de las células, se requiere la aplicación de un campo eléctrico crítico, por debajo del cual, el tratamiento es inefectivo y por encima de este campo, el efecto del tratamiento aumenta al incrementar la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento (Zderic et al., 2013). En el caso de las endrinas, se podría considerar como campo eléctrico crítico 1 kV/cm pues según los resultados obtenidos, tratamientos inferiores a este valor resultarían inefectivos para electroporar sus células. El valor del campo eléctrico crítico, se ha correlacionado con el tamaño celular (Janositz y Knorr, 2010). En el caso de las endrinas, un valor de campo eléctrico crítico de 1 kV/cm, está próximo al observado para otras células de otros tejidos vegetales, como en uva tinta, en arándanos (Saldaña et al., 2017; Pataro et al., 2017), y es mucho menor al campo eléctrico crítico que se requiere para electroporar células microbianas cuyo tamaño es mucho menor. (Grahl y Markl, 1996; Yun et al., 2016)

La **figura 6.2**, muestra la influencia del tiempo de tratamiento (nº de pulsos x anchura de pulso) en la Abs_{520} de una solución al 33% de etanol en agua que contenía endrinas tratadas por PEAV a una intensidad de 3 kV/cm. Se observa que el tratamiento (17 pulsos de 3 μ s) incrementó significativamente la intensidad del color de la solución respecto a muestra control y al tratamiento más corto aplicado (8 pulsos de 3 μ s). Sin embargo, se observó que tratamientos más prolongados no provocaron un aumento tan significativo en la Abs_{520} . Tras 4 días de maceración, no se observaron

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el valor de la Abs_{520} entre aquellos tratamientos con una duración superior a 51 ms (17 pulsos de 3 μ s).

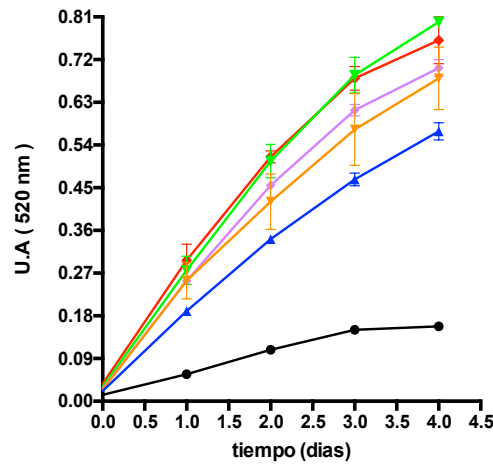


Figura 6.2 Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la extracción de componentes de las endrinas que absorben a 520 nm. Intensidad de campo eléctrico: 3 kV/cm, duración de cada pulso 3 μ s.
 • NT, control; ▲ 8 pulsos; ▼ 17 pulsos; ◆ 33 pulsos; ▼ 67 pulsos; ◆ 100 pulsos.

Los resultados obtenidos en estos estudios preliminares, indicaban que el tratamiento de PEAV, era capaz de electroporar las endrinas y facilitar la extracción de los componentes intracelulares que absorben a una longitud de onda de 520 nm en una solución acuosa que contenía un 33% de etanol. Estos componentes intracelulares que absorbe a esta longitud de onda y que tiñen el líquido de extracción de color rojo son principalmente antocianos. Distintos autores han mostrado previamente la eficacia de los tratamientos de PEAV en la extracción de antocianos de distintas matrices como la patata morada o la piel de la uva tanto en agua como en soluciones de alcohol en agua. (Puértolas et al., 2013; López et al., 2008).

Al igual que lo observado en este estudio, el efecto de los tratamientos de PEAV es función de la intensidad del campo eléctrico aplicado y del tiempo de tratamiento. Nuestro estudio, nos ha permitido comprobar que en el caso de las endrinas, en el rango de intensidades de campo eléctrico aplicado, la extracción de estos componentes aumentó al aumentar la intensidad entre 1 y 5 kV/cm. Sin embargo, por lo que respecta al tiempo de tratamiento, tratamientos superiores a 51 μ s no aumentaron significativamente el efecto. Este efecto confirmaría lo descrito por otros estudios (Lebovkka et al., 2012; De Vito et al., 2008).

6.2. INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DEL CAMPO ELÉCTRICO, DE LA CANTIDAD DE ENDRINAS Y DEL PORCENTAJE DE ETANOL EN EL MEDIO DE MACERACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE COMPONENTES DE LAS ENDRINAS.

Una vez demostrado que los PEAV eran capaces de electroporar las células de las endrinas y facilitar la extracción en una solución alcohólica de los componentes responsables del color rojo, se decidió estudiar la influencia de distintos factores en la extracción tanto de estos componentes (Abs_{520}) como de los polifenoles totales (Abs_{280}).

El paso de componentes que se encuentran en el interior de las células de las endrinas a la solución de etanol en agua es un fenómeno de transferencia de masa que se conoce con el nombre de extracción sólido-líquido. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, esta extracción sólido-líquido depende de numerosos factores como la temperatura, el área de la interfase sólido-líquido, el gradiente de concentración, la resistencia que encuentra la sustancia que se transfiere al paso de una fase a otra etc. Debido que el objetivo final del estudio era evaluar si los PEAV podrían resultar una técnica viable para mejorar el proceso de elaboración del pacharán, se decidió investigar la influencia de tres factores que podrían tener influencia en este proceso como son la relación sólido-líquido (cantidad de endrinas), la concentración de etanol en el medio de extracción y la intensidad del campo eléctrico.

El rango de valores en los que se investigó la influencia de la relación sólido-líquido (100 a 300g/L) y la concentración de etanol (20-40%) se establecieron en función de las indicaciones establecidas por el Consejo Regulador del Pacharán Navarro. Finalmente, por lo que respecta al tratamiento de PEAV se decidió fijar el tiempo de tratamiento en 51 μ s (17 pulsos de 3 μ s), debido a que en los experimentos previos se observó que tiempos más prolongados no aumentaban significativamente el efecto, y estudiar la influencia del campo eléctrico entre 1 y 5 kV/cm debido a que campos eléctricos más intensos resultarían inviables en una posible aplicación industrial.

Para evaluar la influencia de estos tres factores, se decidió realizar un diseño experimental de composición central y analizar los resultados obtenidos mediante

técnicas de regresión múltiple lo que permitió no solo identificar los factores que tenían más influencia, sino también si existían interacciones entre los mismos. Como variables dependientes se utilizaron los valores de la extracción máxima (Y_{\max}) obtenidos al ajustar la ecuación de Fick a las curvas de extracción en las distintas condiciones experimentales tras 53 días de contacto de las endrinas con el medio de extracción.

La **figura 6.3**, muestran algunos ejemplos de las curvas de extracción obtenidas e ilustran la influencia de la intensidad del campo eléctrico (Fig. 6.3A), de la concentración de etanol (Fig. 6.3B) y de la cantidad de endrinas (Fig. 6.3C) en el valor de la Abs_{520} a lo largo del tiempo de extracción. Los puntos se corresponden con los valores experimentales y las líneas con los ajustes del modelo de Fick a estos valores experimentales. Los resultados obtenidos indican que tras 53 días de maceración, la Abs_{520} aumentaba con la intensidad del campo eléctrico (Fig. 6.3A) y que independientemente de la cantidad de etanol en el medio de extracción (Fig. 6.3B) o de la cantidad de endrinas utilizadas (Fig. 6.3C) la aplicación de un tratamiento de PEAV incrementaba el valor de la Abs_{520} . Resultados similares se obtuvieron cuando se midió la Abs_{280} del medio de extracción (datos no mostrados).

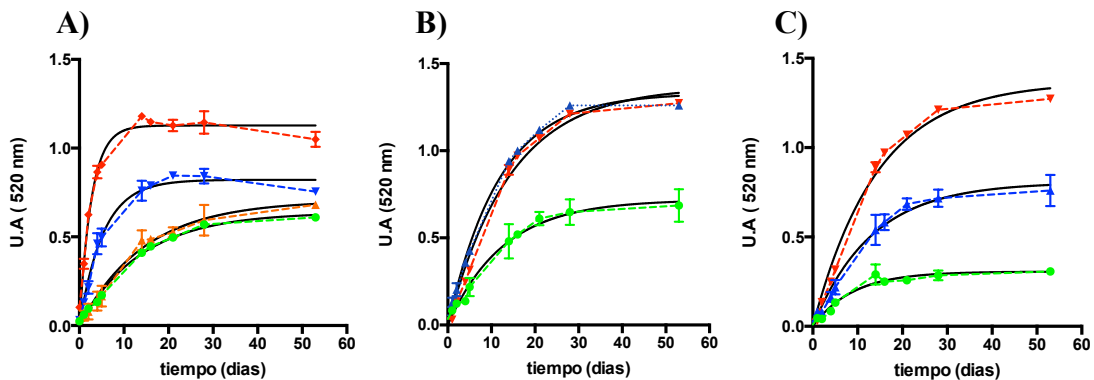


Figura 6.3 Influencia de la intensidad de campo eléctrico (A), concentración de etanos en el medio de extracción (B) y cantidad de endrinas (C) en la extracción de componentes de las endrinas que absorben a 520 nm. Curvas de extracción de color (rojo) Abs_{520} . A (● NT; ▲ 1kV/cm; ▼ 3kV/cm; ◆ 5kV/cm). B (● 20%; ▲ 30%; ▼ 40%). C (● 10g; ▲ 20g; ▼ 30g)

La tabla **6.1**, muestra los valores Y_{\max} y k obtenidos al ajustar la ecuación de Fick a las curvas de extracción obtenidas en las condiciones experimentales establecidas por el diseño de composición central al representar la evolución a lo largo del tiempo de los valores de Abs_{520} (tabla 6.1A) y Abs_{260} (tabla 6.1B). Además, se muestran los intervalos de confianza (95%) de estos valores y los coeficientes de determinación de los ajustes (R^2).

Tabla 6.1A. Valores de Y_{\max} y K obtenidos al ajustar la ecuación 4.5 a las curvas de extracción de componentes que absorben 520nm.

Muestra (kV/cm; % etanol; g endrinas/100g etanol)	Y_{\max} (Abs520 nm)	K (Abs520 nm)	R^2
0 - 20 - 10	0,25 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,93
0 - 20 - 20	0,79 ± 0,11	0,09 ± 0,03	0,93
0 - 20 - 30	0,72 ± 0,07	0,08 ± 0,02	0,96
0 - 30 - 10	0,23 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,96
0 - 30 - 20	0,64 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,99
0 - 30 - 30	1,33 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,99
0 - 40 - 10	0,99 ± 0,72	0,11 ± 0,03	0,95
0 - 40 - 20	0,81 ± 0,07	0,08 ± 0,02	0,97
0 - 40 - 30	1,37 ± 0,10	0,07 ± 0,01	0,99
1 - 20 - 10	0,27 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,96
1 - 20 - 30	1,21 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,98
1 - 30 - 20	0,71 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,97
1 - 40 - 10	0,30 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,96
1 - 40 - 30	1,61 ± 0,10	0,08 ± 0,01	0,99
3 - 20 - 20	0,75 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,99
3 - 30 - 10	0,33 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,94
3 - 30 - 20	0,82 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,98
3 - 30 - 30	1,53 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,98
3 - 40 - 20	1,16 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,96
5 - 20 - 10	0,38 ± 0,02	0,51 ± 0,13	0,93
5 - 20 - 30	1,61 ± 0,10	0,48 ± 0,14	0,92
5 - 30 - 20	1,13 ± 0,04	0,37 ± 0,05	0,98
5 - 40 - 10	0,52 ± 0,03	0,66 ± 0,20	0,91
5 - 40 - 30	2,24 ± 0,06	0,65 ± 0,08	0,98

Tabla 6.1B. Valores de Y_{\max} y K obtenidos al ajustar la ecuación 4.5 a las curvas de extracción de componentes que absorben 280 nm

Muestra (kV/cm; % etanol; g endrinas/100g etanol)	Y_{\max} (Abs280 nm)	K (Abs280 nm)	R^2
0 - 20 - 10	11,00 ± 1,28	0,09 ± 0,03	0,96
0 - 20 - 20	27,63 ± 3,77	0,07 ± 0,02	0,96
0 - 20 - 30	29,61 ± 2,50	0,07 ± 0,02	0,99
0 - 30 - 10	11,89 ± 1,29	0,07 ± 0,02	0,97
0 - 30 - 20	28,57 ± 1,23	0,06 ± 0,01	0,99
0 - 30 - 30	44,98 ± 4,58	0,07 ± 0,02	0,99
0 - 40 - 10	12,45 ± 1,21	0,11 ± 0,03	0,97
0 - 40 - 20	30,41 ± 3,51	0,07 ± 0,02	0,97
0 - 40 - 30	51,73 ± 3,04	0,06 ± 0,01	0,99
1 - 20 - 10	10,94 ± 2,34	0,06 ± 0,03	0,91
1 - 20 - 30	44,82 ± 3,55	0,07 ± 0,01	0,99
1 - 30 - 20	27,03 ± 1,90	0,07 ± 0,01	0,99
1 - 40 - 10	10,49 ± 1,30	0,09 ± 0,03	0,96
1 - 40 - 30	43,54 ± 3,13	0,08 ± 0,02	0,99
3 - 20 - 20	31,26 ± 1,52	0,15 ± 0,03	0,99
3 - 30 - 10	13,22 ± 0,94	0,22 ± 0,07	0,96
3 - 30 - 20	29,26 ± 1,70	0,18 ± 0,04	0,98
3 - 30 - 30	48,40 ± 3,70	0,16 ± 0,05	0,97
3 - 40 - 20	30,78 ± 1,86	0,22 ± 0,06	0,97
5 - 20 - 10	15,28 ± 1,06	0,35 ± 0,10	0,95
5 - 20 - 30	48,24 ± 3,48	0,36 ± 0,11	0,95
5 - 30 - 20	31,49 ± 2,63	0,27 ± 0,09	0,94
5 - 40 - 10	14,32 ± 1,77	0,45 ± 0,24	0,85
5 - 40 - 30	49,36 ± 3,76	0,34 ± 0,11	0,94

En todos los casos, este coeficiente fue superior a 0,90 por lo que el modelo utilizado describió adecuadamente el incremento de la Abs_{520} y Abs_{260} a lo largo del tiempo tanto en las muestras control como en las tratadas por PEAV. El valor de la Y_{max} en las muestras que no habían sido tratadas por PEAV (control), osciló entre 0,23 y 1,36 mientras que en las muestras tratadas por PEAV se alcanzaron valores de hasta 2,23 por lo que el uso de endrinas previamente electroporadas por los PEAV podría permitir alcanzar intensidades de color rojo hasta un 64% más elevadas. Por otro lado, el valor medio de los valores k de las curvas de extracción para los valores Abs_{520} de las muestras control y tratadas a 1 kV/cm resultó inferior a 0,1 mientras que para las muestras que contenían endrinas tratadas a 3 y 5 kV/cm fueron de 0,19 y 0,52 respectivamente, lo que indicaba que la electroporación de las células de las endrinas no solo permitía extraer mayor cantidad de componentes de interés sino que estos se extraían más rápidamente, lo que podría permitir acelerar más de cinco veces la extracción y como consecuencia podría permitir reducir el tiempo de contacto de las endrinas con el anís necesario para conseguir una pacharán con unas determinadas características.

Con objeto de evaluar el efecto de electroporar las endrinas en el proceso de extracción y poder cuantificar la influencia de los tres factores investigados (cantidad de endrinas, la concentración de etanol en el medio de extracción e intensidad del campo eléctrico) sobre el valor máximo de la Abs_{520} del medio de extracción ($Y_{Abs520\ max}$) los datos de la tabla correspondientes a las muestras sin tratar y tratadas por PEAV se describieron matemáticamente utilizando técnicas de regresión múltiple. Dicha técnica permitió obtener la **ecuación 6.1**, que se corresponde con los experimentos realizados con las endrinas sin tratar, y la **ecuación 6.2**, que se corresponde con los experimentos realizados con las muestras tratadas por PEAV.

$$Y_{Abs520\ max} = +0,265 - 0,014 \times Et + 2,7409 \times 10^{-17} \times End + 0,001 \times Et \times End$$

(Ecuación 6.1)

$$Y_{Abs520\ max} = 0,792 - 0,007 \times E - 0,07 \times Et + 0,02 \times End + 0,005 \times E \times End + 0,008 \times E \times End + 0,001 E^2$$

(Ecuación 6.2)

Donde $Y_{Abs520max}$ se corresponde con la máxima absorbancia a 520 nm del medio de extracción, E con la intensidad del campo eléctrico, Et con la concentración de etanol en el medio de extracción y End con la concentración de endrinas en el medio de extracción.

Como se desprende de la ecuación 6.1, el procedimiento de regresión múltiple hacia atrás eliminó de la ecuación cuadrática inicial los términos elevados al cuadrado de la concentración de etanol y de endrinas. En el caso de la ecuación 6.2, el procedimiento de regresión múltiple hacia atrás eliminó de la ecuación cuadrática inicial tres términos que se corresponden con la interacción de la intensidad del campo eléctrico con la concentración de etanol y los términos elevados al cuadrado de la concentración de etanol y de endrinas.

La tabla 6.2, muestra el análisis ANOVA de los modelos de regresión obtenidos. En el caso de la ecuación 6.1 tanto el valor R^2 como R^2 -ajustado del modelo eran superiores a 0,90 lo que indica que solo el 10% de la variación total observada al modificar los parámetros no es explicada por el modelo. El valor F del modelo era 30,38 lo que implica que el modelo era significativo ($p < 0.001$). Según los valores F de los distintos parámetros del modelo la cantidad de endrinas utilizadas en la extracción era el factor que más influencia tenía en el valor máximo de la Abs_{520} cuando se utilizaron endrinas sin electroporar. Por lo que respecta a la ecuación 6.2 tanto el valor R^2 como R^2 -ajustado del modelo estaban próximos a 1 (0,99 y 0,98 respectivamente) lo que indica que solo el 1% de la variación total observada al modificar los parámetros no es explicada por el modelo. El valor F del modelo era 155,8 lo que indica que el modelo era significativo ($p < 0.0001$). Según los valores F, cuando la maceración se realizó con endrinas tratadas por PEAV, la interacción del campo eléctrico con la cantidad de endrinas utilizadas en la extracción era el factor que más influencia tenía en el valor máximo de la Abs_{520} seguido de la intensidad del campo eléctrico. El único término que aparece elevado al cuadrado (concentración de etanol) en la ecuación resultó ser el factor que menos peso tuvo en la respuesta.

Tabla 6.2 Análisis ANOVA de los modelos de regresión múltiples obtenidos en la Ecuación 6.1 y 6.2

	Ecuación 6.1		Ecuación 6.2	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Modelo	30,38	0,0012	155,81	<0,0001
E	--	--	69,26	<0,0001
Et	8,90	0,0307	38,30	0,0003
End	76,57	0,0003	790,83	<0,0001
E x End	--	--	15,96	0,004
Et x End	5,67	0,0630	11,74	0,009
E ²	--	--	8,80	0,018
R ²	0,95		0,99	
R ² adj	0,92		0,99	

La **Figura 6.4**, muestra las gráficas de superficie de respuesta que relacionan la máxima Abs_{520} del medio de extracción en función de la concentración de etanol y la cantidad de endrinas no tratadas por PEAV (Fig. 6.4A) y en función de la concentración de etanol y la cantidad de endrinas tratadas por PEAV a una intensidad de 5 kV/cm (Fig. 6.4B).

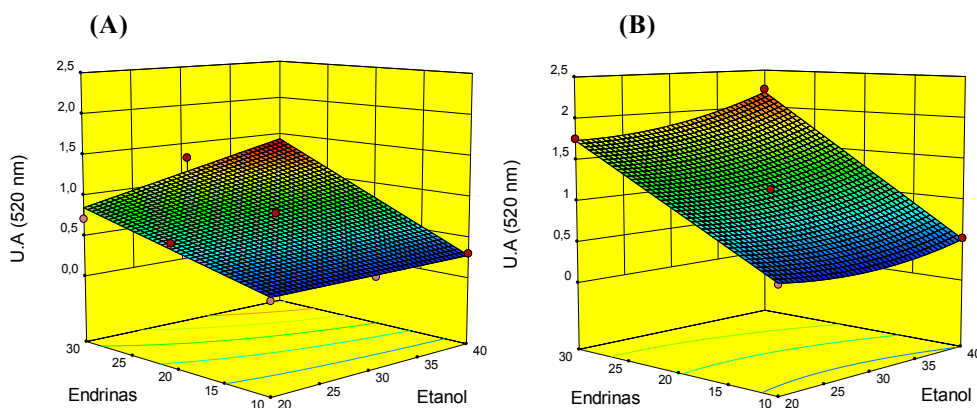


Figura 6.4. Gráfica de superficie respuesta de la Abs_{520} en función de la cantidad de endrinas en el medio (g endrinas/100g etanol) y etanol (% vol.). (A) Endrinas no tratadas por PEAV (B) Endrinas tratadas por PEAV (E=5kV/cm)

Se observa que influencia de la concentración de etanol y la cantidad de endrinas fue distinta dependiendo si se trabajó con endrinas tratadas o sin tratadas por PEAV. En el caso de las muestras no tratadas por PEAV, el incremento de ambos factores provocó que $Y_{Abs520max}$ aumentara linealmente y se observó que como consecuencia de la interacción de ambos factores, la influencia de la concentración de etanol era mayor cuanto mayor era la concentración de endrinas. En el caso de la extracción realizada con las endrinas tratadas a la mayor intensidad de campo eléctrico (5 kV/cm), mientras que el incremento de la cantidad de endrinas aumentó linealmente el valor de

$Y_{Abs520max}$, el aumento de la concentración de etanol solo tuvo un efecto significativo en el valor de $Y_{Abs520max}$ entre 30 y 40%.

6.3. ELABORACIÓN TRADICIONAL DE PACHARÁN CON ENDRINAS TRATADAS POR PEAV

Una vez comprobado que la electroporación de las endrinas mediante un tratamiento de PEAV permitía no solo acelerar la extracción de los componentes responsables del color rojo del medio de extracción sino también de obtener mayor cantidad de estos componentes y cuantificar la influencia de la intensidad del campo eléctrico, la cantidad de etanol y la cantidad de endrinas en el efecto observado, se decidió elaborar Pacharán por el procedimiento tradicional con endrinas tratadas por PEAV.

Considerando las características del proceso tradicional de elaboración del Pacharán establecido por la IGP Pacharán de Navarra, se utilizaron la cantidad mínima (150 g/L) y máxima (300 g/l) de endrinas indicadas en el expediente técnico de la IGP, las cuales se maceraron en anís con un contenido alcohólico del 25%. Para evaluar las posibles ventajas del tratamiento de PEAV en el proceso de elaboración del Pacharán, se monitorizó a lo largo del tiempo de maceración, además de los parámetros establecidos por la IGP (Abs_{420} , Abs_{520} Abs_{620}), el contenido en antocianos totales y el índice de polifenoles totales (IPT) del anís macerando con endrinas sin tratar y previamente tratadas por PEAV de una intensidad de 5 kV/cm.

La **Figura 6.5**, muestra la evolución de la Abs_{420} (Fig. 6.5A) Abs_{520} (Fig. 6.5B) y Abs_{620} (Fig. 6.5C) del anís que contenía 150 y 300 g/L de endrinas tratadas y sin tratar por PEAV durante 170 días de maceración. Además, se muestra la evolución de estos índices en un anís que contenía 300 g/L de endrinas tratadas por PEAV y cuyas endrinas se separaron del anís tras 8 días de maceración debido a que los valores de Abs_{420} , Abs_{520} y Abs_{620} eran superiores a los establecidos por la IGP para el Pacharán terminado. Las líneas discontinuas horizontales se corresponden con el rango de los valores de estos índices que tiene que tener el Pacharán terminado.

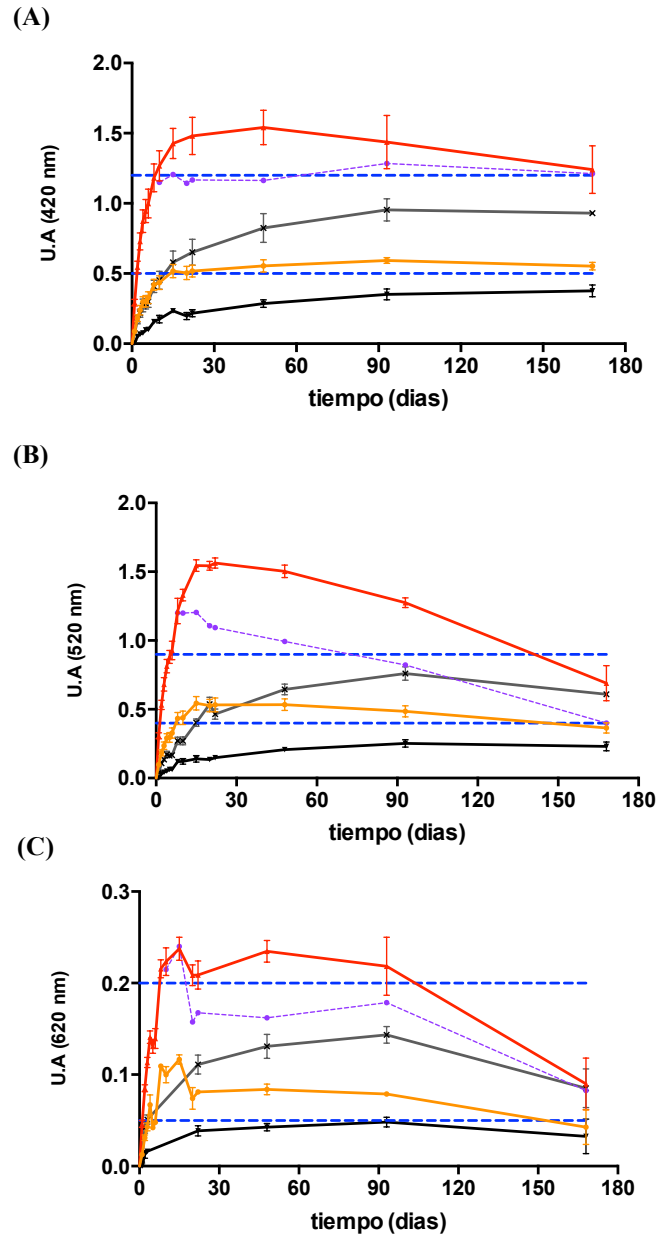


Figura 6.5 Evolución de Abs_{420} (A) Abs_{520} (B) y Abs_{620} (C) durante el proceso de elaboración de pacharán con 150 y 300 gramos de endrinas sin tratar y tratadas por PEAV. ▼ NT, control 150g/L; X NT, control 300g/L; ● PEAV 5kV/cm 150g/L; ▲ PEAV 5kV/cm 300g/L; ● PEAV 5kV/cm 300g/L endrinas retiradas día 8 de maceración.

Como era de esperar de los resultados obtenidos en los experimentos previos, el tratamiento previo de las endrinas con PEAV provocaba un incremento más rápido y mayor de los tres índices que determinan el color del Pacharán. Tras 8 días de maceración de las endrinas (300 g/L) tratadas con PEAV la Abs_{520} superaba en un 25% la intensidad máxima para este índice establecida por la IGP. El valor máximo de este índice que superaba en un 60 % la intensidad máxima establecida se alcanzó a los 15 días de maceración. Al compararlo con la muestra que contenía la misma cantidad de endrinas sin tratar, se observó que tras 15 días de maceración se alcanzaba el valor

mínimo de Abs_{520} establecido por la IGP siendo este valor 3,8 veces inferior al obtenido con las muestras tratadas por PEAV. Desde un punto de vista práctico, estos resultados indican que el tratamiento de PEAV permitiría reducir de 300 a 79 g las endrinas necesarias para conseguir un Pacharán con la mínima Abs_{520} para que el producto se pudiera comercializar, o permitiría que con la misma cantidad de endrinas (300 g/l), obtener 2,8 litros más Pacharán en lugar de 1 litro.

Por otro lado, tras 15 días de maceración el Pacharán que contenía solamente 150g/L de endrinas tratadas por PEAV tenía una Abs_{520} superior al del que se elaboró con endrinas sin tratar a una concentración de 300 g/L. En el caso del pacharán elaborado con las endrinas sin tratar, a una concentración de 150g/L no se alcanzaron los valores mínimos de Abs_{520} establecidos por la IGP incluso tras 170 días de maceración.

Por lo que respecta a la evolución de la Abs_{520} una vez alcanzado el valor máximo en todos los casos se observó que esta disminuía con el tiempo. Este descenso se observó que comenzaba a partir de los 22 días de maceración en la muestra que contenía 300 g/L de endrinas tratadas por PEAV, a los 15 días en la muestra donde se retiraron las endrinas a los 8 días, sobre los 90 días en las muestras control que contenía 300 g/L de endrinas y a los 22 días en la muestra que contenía una concentración de 150 g/L de endrinas tratadas por PEAV. El descenso de la Abs_{520} más marcado se observó en las muestras donde este índice fue mayor (muestra que contenía 300 g/L de endrinas tratadas por PEAV durante 8 días y durante todo el periodo de maceración). En estas muestras se observó que las líneas que describían el descenso de la Abs_{520} a lo largo del tiempo eran prácticamente paralelas.

Los principales responsables del color rojo del pacharán son los antocianos. La **Figura 6.6** muestra que la evolución de los antocianos en las distintas muestras, fue similar a la evolución de la Abs_{520} , confirmando que estos compuestos son los responsables del color rojo del Pacharán. Es bien conocido que en procesos donde se produce una extracción de antocianos como en la elaboración de vino tinto, estos alcanzan un valor máximo durante los primeros días de maceración y luego su concentración disminuye provocando un descenso de la intensidad de color rojo (Abs_{520}). (Puertolas et al., 2010). Este descenso se atribuye a distintos fenómenos

como son reacciones de oxidación, reacciones de condensación de los antocianos con otros polifenoles y reacciones de precipitación de los antocianos. Este tipo de reacciones bien conocidas en el caso del proceso de elaboración del vino tinto, podrían ser también las responsables del descenso del contenido en antocianos y como consecuencia de la intensidad de color en el Pacharán. El descenso más marcado observado en la muestra que contenía 300 g/L de endrinas tratadas por PEAV o en la que se maceró solamente durante 8 días, podría ser debido en el primer caso, a que tras 15 días de maceración se extrajeron todos los antocianos presentes en las endrinas y en el segundo, a que al retirar las endrinas no había ningún aporte posterior de antocianos al anís. En el caso de la muestra control, el descenso de la concentración de antocianos es menos marcado debido a que se podrían ir compensando los antocianos que se oxidan, condensan o precipitan con los que se siguen liberando de las endrinas presentes en el anís. Para comprobar esta hipótesis, se debería haber realizado una prueba separando las endrinas sin tratar por PEAV del anís una vez superado los valores mínimos de los parámetros establecidos por la IGP.

Finalmente, la **figura 6.7**, muestra la evolución del IPT para las distintas muestras. Al igual que en el caso de Abs_{420} , Abs_{520} , Abs_{620} y de los antocianos totales la extracción de polifenoles fue más rápida y eficaz en las muestras que contenían endrinas tratadas por PEAV. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el caso de la Abs_{520} y antocianos totales en el caso del IPT el valor se mantuvo constante una vez alcanzado la máxima extracción de polifenoles tanto cuando se mantuvieron las endrinas en contacto con el anís como cuando se separaron las endrinas tras 8 días de maceración. Por otro lado, al final del periodo de maceración los valores IPT de las muestras que contenían endrinas sin tratar por PEAV tendían a igualarse con el de las muestras que contenían endrinas tratadas por PEAV. Estos resultados indicarían que, a diferencia de los antocianos, en el caso de los polifenoles no se producen reacciones que provoquen su pérdida en el medio.

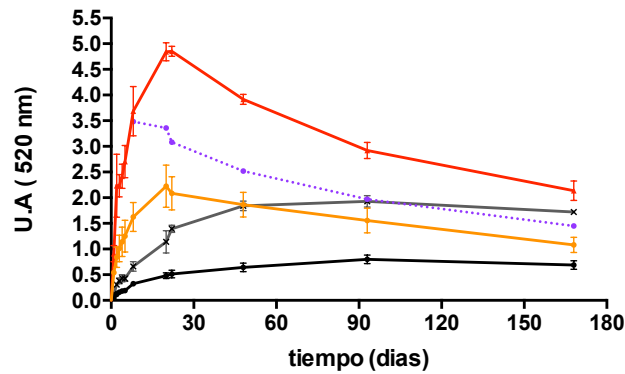


Figura 6.6 Evolución del contenido en antocianos durante el proceso de elaboración de pacharán con 150 y 300 gramos de endrinas sin tratar y tratadas por PEAV. ▼ NT, control 150g/L; X NT, control 300g/L; ● PEAV 5kV/cm 150g/L; ▲ PEAV 5kV/cm 300g/L; ● PEAV 5kV/cm 300g/L endrinas retiradas día 8 de maceración.

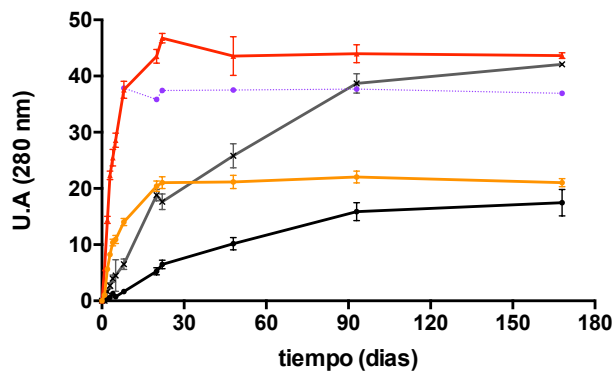


Figura 6.7 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el proceso de elaboración de pacharán con 150 y 300 gramos de endrinas sin tratar y tratadas por PEAV. ▼ NT, control 150g/L; X NT, control 300g/L; ● PEAV 5kV/cm 150g/L; ▲ PEAV 5kV/cm 300g/L; ● PEAV 5kV/cm 300g/L endrinas retiradas día 8 de maceración.

En conclusión, los resultados obtenidos en el proceso de elaboración del pacharán con endrinas tratadas por PEAV confirman los estudios previos realizados en sistemas modelo. La elaboración del pacharán con endrinas tratadas con PEAV permite reducir el tiempo de maceración, obtener más cantidad de pacharán con menos endrinas o aumentar la cantidad de pacharán obtenido con la misma cantidad de endrinas.

7. CONCLUSIONES

- La electroporación de las endrinas mediante un tratamiento de PEAV a intensidades superiores a 1 kV/cm, mejoró significativamente la extracción de compuestos que absorben a una longitud de onda de 520 nm (color rojo) en una solución acuosa de etanol (33%).
- La electroporación de las endrinas afectó a la influencia que la concentración de etanol en el medio de extracción tiene sobre la extracción de compuestos que absorben a una longitud de onda de 520 nm. Cuando las endrinas no se trataron, la Abs_{520} aumentó linealmente al aumentar la concentración de etanol entre 20 y 40%. Sin embargo, cuando se trataron previamente por PEAV, el incremento en la concentración de etanol entre 20 y 30% no provocó un aumento significativo en la Abs_{520} del medio de extracción.
- Durante la elaboración de pacharán por el procedimiento tradicional, la electroporación de las endrinas aceleró e incrementó la extracción de componentes responsables de la $Abs_{420,520,620}$, de los antocianos y de los polifenoles totales al anís.
- La elaboración de pacharán con endrinas tratadas por PEAV podría resultar una técnica viable en la industria para reducir el tiempo de maceración en el proceso de elaboración de pacharán, elaborar el pacharán con menos cantidad de endrinas u obtener más cantidad de pacharán con una determinada cantidad de endrinas.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. Springer Science & Business Media.
- Álvarez I, Condón S, Raso J (2006). Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields, En: J Raso y V Heinz (Eds) Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry, Springer US, Nueva York, 97-129.
- Baier, A.K, Bußler S, Knorr D. (2015). Potential of high isostatic pressure and pulsed electric fields to improve mass transport in pea tissue. *Food Research International*, 76 (2015), pp. 66–73
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120(1), 247-254.
- Bobinaite, R., Pataro, G., Lamanaukas, N., Satkauskas, S., Viskelis, P., & Ferrari, G. (2015). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(9), 5898-5905.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L. H., Cordin-Falcimaigne, A., & Lanoiselle, J. (2012). Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *Lwt-Food Science and Technology*, 46(1), 127-134.
- Bouzrara, H., & Vorobiev, E. (2000). Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. *International Sugar Journal*, 102(1216), 194-+.
- Bouzrara, H., & Vorobiev, E. (2003). Solid-liquid expression of cellular materials enhanced by pulsed electric field. *Chemical Engineering and Processing*, 42(4), 249-257.

- Burin, V. M., Falcao, L. D., Gonzaga, L. V., Fett, R., Rosier, J. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2010). Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 30(4), 1027-1032.
- Cacace, J., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389.
- Calderón-Miranda, M.L M. Fernanda, S. Martín, G.V. Barbosa-Cánovas, B.G. Swanson. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana I I, pp. 3–11
- Calvo, M. I., & Caverro, R. Y. (2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in navarra and their validation from official sources. *Journal of Ethnopharmacology*, 157, 268-273.
- Climent-Giner, Daniel (2015). De la barba a la mesa. Artículo Etnobotánica del endrino. Revista Mètode (Universitat de Valencia). Publicada versión online 13/5/2015
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- Cregenzan-Alberti, O., Halpin, R. M., Whyte, P., Lyng, J. G., & Noci, F. (2015). Study of the suitability of the central composite design to predict the inactivation kinetics by pulsed electric fields (PEF) in escherichia coli, staphylococcus aureus and pseudomonas fluorescens in milk. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 313-322.
- De Vito, F., Ferrari, G., Lebovka, N. I., Shynkaryk, N. V., & Vorobiev, E. (2008). Pulse duration and efficiency of soft cellular tissue disintegration by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 1(4), 307-313.

- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (1997). Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*tagetes erecta*). *Food Chemistry*, 58(3), 255-258.
- Donsi, F., Ferrari, G., Fruiolo, M., & Pataro, G. (2010). Pulsed electric field-assisted vinification of aglianico and piedirosso grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11606-11615.
- Donsi, F., Ferrari, G., & Pataro, G. (2010). Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. *Food Engineering Reviews*, 2(2), 109-130.
- Eshtiaghi, M., & Knorr, D. (2002). High electric field pulse pretreatment: Potential for sugar beet processing. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 265-272.
- Expediente Técnico de la Indicación Geográfica Protegida Pacharán Navarro. Agosto 2015
- Ganhao, R., Estevez, M., Kylli, P., Heinonen, M., & Morcuende, D. (2010). Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8854-8861.
- Garcia, D., Gomez, N., Manas, P., Raso, J., & Pagan, R. (2007). Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 219-227.
- García Bona, L. M. (1981). Navarra, plantas medicinales. Ed. Caja de Ahorros de Navarra, p. 201
- Girones-Vilaplana, A., Calin-Sanchez, A., Moreno, D. A., Carbonell-Barrachina, A. A., & Garcia-Viguera, C. (2015). Novel maqui liquor using traditional pacharan processing. *Food Chemistry*, 173, 1228-1235.

- Girones-Vilaplana, A., Valentao, P., Moreno, D. A., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., & Andrade, P. B. (2012). New beverages of lemon juice enriched with the exotic berries maqui, acai, and blackthorn: Bioactive components and in vitro biological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(26), 6571-6580.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2ème partie mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, v. 18, p. 253-271
- Gongora-Nieto, M., Sepulveda, D., Pedrow, P., Barbosa-Canovas, G., & Swanson, B. (2002). Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 35(5), 375-388.
- Grahl, T., & Markl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1-2), 148-157.
- Guerrero, M. S., Torres, J. S., & Nunez, M. J. (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology*, 99(5), 1311-1318.
- Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Deslis, S., Fabiano-Tixier, A. -, Pierre, F. -, Bily, A., et al. (2016). Towards a "dry" bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry*, 18(10), 3106-3115.
- Janositz, A., & Knorr, D. (2010). Microscopic visualization of pulsed electric field induced changes on plant cellular level. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 592-597.
- Kazazi, H., Rezaei, K., Ghotb-Sharif, S. J., Emam-Djomeh, Z., & Yamini, Y. (2007). Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from hyssopus officinalis L. cultivated in iran. *Food Chemistry*, 105(2), 805-811.

- Lebovka, N., Bazhal, M., & Vorobiev, E. (2002). Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54(4), 337-346.
- Loginova, K. V., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2011). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 127-133.
- Lopez, N., Puertolas, E., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2008). Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: Influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1099-1107.
- Lopez, N., Puertolas, E., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2008). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 477-482.
- Lopez, N., Puertolas, E., Condon, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 60-66.
- Luengo, E., Alvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 79-84.
- Luengo, E., Manuel Martinez, J., Alvarez, I., & Raso, J. (2016). Effects of millisecond and microsecond pulsed electric fields on red beet cell disintegration and extraction of betanines. *Industrial Crops and Products*, 84, 28-33.
- Ou, Q., Nikolic-Jaric, M., & Ganzle, M. (2017). Mechanisms of inactivation of *Candida humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Bioelectrochemistry*, 115, 47-55.
- Pataro, G., Bobinaite, R., Bobinas, C., Satkauskas, S., Raudonis, R., Visockis, M., et al. (2017). Improving the extraction of juice and anthocyanins from

blueberry fruits and their by-products by application of pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), 1595-1605.

- Pinelo, M., Sineiro, J., & Nunez, M. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77(1), 57-63.
- Puertolas, E., Cregenzan, O., Luengo, E., Alvarez, I., & Raso, J. (2013). Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1330-1336.
- Puertolas, E., Hernandez-Orte, P., Sladana, G., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. evolution of chromatic parameters and phenolic content of cabernet sauvignon red wines. *Food Research International*, 43(3), 761-766.
- Ramos T, Macheix JJ (1990) Pantes méd Phytothér 24: 14–20
- Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J., et al. (2016). Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 312-321.
- Ribéreau-Gayon, P. et al. Handbook of Enology - Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. England: John Wiley & Sons Ed., 2006. p. 441.
- Ruiz-Hernández M, 2004. Tratado de Vinificación en tinto. Ed: Mundi-Prensa. Madrid.
- Sacchi, K., Bisson, L., & Adams, D. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.
- Saldana, G., Cebrian, G., Abenoza, M., Sanchez-Gimeno, C., Alvarez, I., & Raso, J. (2017). Assessing the efficacy of PEF treatments for improving

polyphenol extraction during red wine vinifications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 179-187.

- Segovia, F. J., Luengo, E., Corral-Perez, J. J., Raso, J., & Pilar Almajano, M. (2015). Improvements in the aqueous extraction of polyphenols from borage (*borago officinalis* L.) leaves by pulsed electric fields: Pulsed electric fields (PEF) applications. *Industrial Crops and Products*, 65, 390-396.
- Sokół-Lętowska, A., Kucharska, A. Z., Wińska, K., Szumny, A., Nawirska-Olszańska, A., Mizgier, P., et al. (2014). *Composition and antioxidant activity of red fruit liqueurs*. *Food Chemistry*, 2014, 157, 533-539
- Vilku, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Yu, J., Dandekar, D. V., Toledo, R. T., Singh, R. K., & Patil, B. S. (2007). Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*citrus paradisi* macf.) seeds. *Food Chemistry*, 105(3), 1026-1031.
- Yun, O., Zeng, X., Brennan, C. S., & Han, Z. (2016). Effect of pulsed electric field on membrane lipids and oxidative injury of salmonella typhimurium. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1374.
- Zderic, A., Zondervan, E., & Meuldijk, J. (2013). Breakage of cellular tissue by pulsed electric field: Extraction of polyphenols from fresh tea leaves. *Icheap-11: 11th International Conference on Chemical and Process Engineering, Pts 1-4*, 32, 1795-1800.