

ISSN: 2322-7672

II Encuentro de Investigación Formativa Ingeniería Industrial Medellín

Memorias

Diana Rocío Roldán Medina
Beatriz Elena Ángel Álvarez
Compiladoras



Universidad
Pontificia
Bolivariana

© Diana Rocío Roldán Medina (Compiladora)
© Beatriz Elena Ángel Álvarez (Compiladora)
© Editorial Universidad Pontificia Bolivariana

II Encuentro de Investigación Formativa - Memorias

ISSN: 2322-7672

Primera edición, 2012

Escuela de Ingenierías

Facultad de Ingeniería Industrial

Gran Canciller UPB y Arzobispo de Medellín: Mons. Ricardo Tobón Restrepo

Rector General: Mons. Luis Fernando Rodríguez Velásquez

Vicerrector Académico: Pbro. Jorge Iván Ramírez Aguirre

Editor: Juan José García Posada

Coordinación de producción: Ana Milena Gómez C.

Diagramación: Juan Esteban Casas Tejada

Corrector de estilo: César Alejandro Buriticá

Dirección editorial:

Editorial Universidad Pontificia Bolivariana, 2012

Email: editorial@upb.edu.co

www.upb.edu.co

Telefax: (57) (4) 354 4565

A.A. 56006 - Medellín - Colombia

Radicado: 1037-16-08-12

Prohibida la reproducción total o parcial, en cualquier medio o para cualquier propósito sin la autorización escrita de la Editorial Universidad Pontificia Bolivariana.

Diseño de experimentos sobre el comportamiento de la absorbancia en el banano

Sandra Serna Botero

Universidad Pontificia Bolivariana
sandramilena.sernabo@alfa.upb.edu.co

Stephanía Casas Pinilla

Universidad Pontificia Bolivariana
stephania.casas@alfa.upb.edu.co

Rosa Gómez Cano

Universidad Pontificia Bolivariana
rosabeatriz.gomez@alfa.upb.edu.co

Marisol Valencia Cárdenas

Universidad Pontificia Bolivariana
marisol.valencia@upb.edu.co

Abstract

In ripening and aging in vegetables and fruits, like banana, object of this study, one of the more important natural processes is browning caused by tirosinasa enzima. Investigation of this effect is so much important to mature control, storing, transport and final quality of natural exportable products, with high worth. In this work this phenomenon is analyzed using experiments of enzymatic inhibition and applying techniques of experimental design.

Keywords: Design and analysis of experiments, absorbancia, quality of food products.

Resumen

En la madurez y envejecimiento de las especies vegetales y frutales, entre ellas el banano, fruto objeto de este estudio, uno de los procesos naturales más importantes es el pardeamiento causado por la enzima tirosinasa. La investigación acerca de este efecto es importante para el control de la maduración, almacenamiento, transporte y calidad final de los productos naturales exportables con un apreciable valor agregado. En este trabajo se analiza dicho fenómeno usando experimentos de inhibición enzimática, y aplicando las técnicas de un diseño experimental.

Palabras clave: Análisis y diseño de experimentos, Absorbancia, calidad de productos alimenticios.

Introducción

El pardeamiento enzimático en las frutas se atribuye a la actividad de la polifenol oxidasa, una cobre proteína que actúa en los compuestos fenólicos, causando su oxidación y polimerización. Es una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular, catalizada por un tipo de enzimas que se pueden encontrar en prácticamente todos los seres vivos, desde las bacterias al hombre, donde es la responsable de la formación de pigmentos del pelo y de la piel.

En el caso del análisis que se llevará a cabo, cabe anotar que los bananos son susceptibles de daño mecánico durante la cosecha, transporte, almacenamiento y procesamiento, lo cual causa estrés que afecta el metabolismo fenólico, es decir, las enzimas son activadas al momento de la cosecha por lo que durante la maduración se producen cambios en la actividad enzimática que alteran las estructuras subcelulares.

Con el fin de controlar el pardeamiento enzimático del banano, se ha desarrollado una secuencia de experimentos de inhibición enzimática basada en el sistema enzima-sustrato-inhibidor (tirosinasa-catecol-inhibidor), luego se realizan los cálculos respectivos que la literatura propone, usando las ecuaciones de Michaelis-Menten, Lineweaver Burk y Eadie Hofstee.

De aquí en adelante se realiza un completo análisis estadístico del experimento planteado y como herramienta de análisis se utiliza el software R, en cual se ingresan los datos y se empieza con el análisis.

Metodología

Definición del problema.

El problema consiste en observar la incidencia al inyectar un inhibidor a varias sustancias, para establecer cómo empieza a disminuir la velocidad de crecimiento de la tirosinasa en las frutas, evitando el pardeamiento de éstas, en este caso el banano.

Los datos medidos son las absorbancias de las diferentes soluciones en tiempos recomendados por la literatura, con el fin de determinar la concentración de éstas y así mirar el comportamiento de la enzima.

Elección del factor de interés, sus niveles y el factor de bloqueo

El factor de interés = Sustancia, usando 5 en total.

Estas sustancias contienen cada una Catecol, tirosinasa, inhibidor (EDTA), buffer pH=6, cada una con respectivos volúmenes.

El factor de bloqueo = Tiempo, usando 5 niveles medidos en segundos, así:

1. 15
2. 30
3. 45
4. 60
5. 75

Los tiempos también son designados en la literatura, donde se dice que cada 15 segundos hay una reacción en las sustancias.

Elección de la variable respuesta

La variable respuesta **Y**: Absorbancia

Elección del diseño experimental

Se utilizará un diseño con bloques completamente aleatorizado (DBCA), es decir, un factor y un bloque

Procedimiento experimental

Para la determinación de la concentración del banano se utilizó una fruta de procedencia doméstica, la cual no contaba con ningún tipo de cuidado que evitara que hiciera su proceso natural de oxidación. Para comenzar el proceso se preparó la solución de sustrato utilizando Catecol, en una solución de buffer pH = 6.0, tal que se pesaron 0.3368g de sustrato, para preparar la solución de concentración 0.032 M. A partir de esta solución se prepararon dos series de soluciones de Catecol diluyendo 6 volúmenes entre 0.5 y 3 ml, tal que se completaron a 4 ml con la solución buffer. La preparación del extracto enzimático se realizó triturando aproximadamente 26 gramos de banano ayudado con sílica gel, en un mortero con 60 ml de solución buffer de fosfato de concentración El blanco de reactivos se preparó con solución buffer de fosfato pH=6.0, se colocó en una cubeta de acrílico usada y se ubicó en el haz de referencia del espectrofotómetro (medidor de absorbancia). Para continuar con las lecturas en el espectrofotómetro, se adicionaron 30ml del extracto enzimático a los tubos de ensayo que contienen la solución de Catecol y buffer pH=6.0, tomando la precaución de activar el cronómetro para obtener datos de absorbancia vs tiempo, para cada una de las soluciones de extracto preparadas. (Este proceso se realizó en un lapso de 15 segundos). Se empleará entonces EDTA como inhibidor en este caso, el cual es adicionado antes de medir la absorbancia en el espectrofotómetro.

Figura 1. Procedimiento en laboratorio de química UPB.



Resultados

Los siguientes son los datos del diseño experimental realizado.

Tabla 1. Datos de absorbancia tomados

Factor: sustancia	Bloque: tiempo				
	15	30	45	60	75
1	0,028	0,03	0,032	0,034	0,036
2	0,018	0,021	0,024	0,026	0,029
3	0,004	0,002	0,009	0,015	0,022
4	0,014	0,007	0,001	0,009	0,017
5	0,014	0,008	0,001	0,004	0,01

Sobre estos datos se realizó la transformación de logaritmo natural, ya que el supuesto de incorrelación en los residuales no se cumplía.

Tabla de Análisis de Varianza

En el análisis de varianza se aprecia la significancia estadística del factor Sustancia, con un nivel del 5%, indicando que produce cambios importantes sobre la absorbancia.

Tabla 2. Análisis de Varianza para el Diseño experimental de Absorbancia

Tabla de analisis de varianza					
Fuentes de variación	grados de libertad	suma de cuadros	cuadrados medios	F value	vp
Sustancia	4	12,8388	3,2097	5,7121	0,0042723
Tiempo	4	4,4914	1,1229	1,9983	0,1433
Error	16	8,9907	0,5629		

Eficiencia de la inclusión del bloque.

$$e_r = (g_e + 1) (g_e^2 + 3) \text{MSEDCA} / ((g_e + 3)(g_e^2 + 1) \text{MSEDBCA})$$

$$e_r = (16 + 1) (20 + 3) \text{MSEDCA} / (16 + 3)(20 + 1) (0.5629)$$

$$\text{MSEDCA} = (4) (1.1229) + (4+16) 0.5629 / 4+4+16$$

$$\text{MSEDCA} = 0.65$$

Entonces la eficiencia es:

$$e_r = 113.15\%$$

Recordando:

Si $E_r = 100$, no ha aportado el bloque.

Si $E_r < 100$ No ha sido útil incorporarlo.

Si $E_r > 100$ Ha sido útil.

Entonces como la eficiencia dio mayor al 100%, se dice que ha sido útil el factor de bloqueo incorporado.

También con el análisis de varianza se observa que el cuadrado medio del factor de bloqueo, es decir, el MSC (tiempo) es mayor al cuadrado medio del error (MSE), lo que se concluye que es eficiente incorporarlo al modelo.

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

H_0 : Los errores tienen una distribución normal

H_1 : Los errores no tienen una distribución normal

$$W = 0.9496, p\text{-value} = 0.2456$$

Como $V_p > 0,05$, se acepta H_0 , lo que indica que se presenta una distribución normal.

Shapiro-Wilk normality test por nivel

W = 0.9495, p-value = 0.7334

W = 0.8867, p-value = 0.3408

W = 0.8566, p-value = 0.2162

W = 0.7801, p-value = 0.05519

W = 0.9552, p-value = 0.7743

Los Vp de todos de niveles de las sustancias son mayores a 0,05; por lo tanto los residuales tienen normalidad.

Prueba de varianza constante de Bartlett's

$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \dots \sigma_a^2$; hay homogeneidad en las varianzas de los residuales

$H_1 : \text{Al menos un par } \sigma_i \neq \sigma_j$; no hay homogeneidad en las varianzas de los residuales.

P-value = 0.6197

Como $V_p > 0,05$, se acepta H_0 , lo que indica que hay homogeneidad en las varianzas de los residuales.

DurbinWatsonTest

P-value = 0.102

Como $V_p > 2^* 0,05$, se acepta H_0 , lo que indica que hay incorrelación en los residuales.

Los supuestos de los residuales se cumplen, lo cual sugiere que es posible confiar en las inferencias derivadas de este diseño experimental.

Prueba de Tukey

Los intervalos de confianza para cada diferencia de medias, para este procedimiento la diferencia de medias entre los niveles del factor de interés son:

Tabla 3. Intervalos de Confianza al 95% para las diferencias de medias.

Sustancias	Límite inf.	Límite sup.
4-5.	-1,121	1,69
3-5.	1,118	1,79
2-5.	0,013	2,92
1-5.	0,327	3,23
3-4.	1,36	1,54
2-4.	0,227	2,68
1-4.	0,0864	2,99
2-3.	-0,319	2,58
1-3.	-0,005	2,90
1-2.	-1,138	1,77

De acuerdo a la tabla, se concluye que:

Los pares absorbancia media iguales se dan para las sustancias: 4 y 5, 2 y 3, 1 y 3, 1 y 2.

Y las sustancias que generan mayor absorbancia media serán: 1 al compararla con la 4 y la 5, 2 al compararla con la 4 y la 5, 3 al compararla con la 4 y la 5. Por lo tanto, puede decirse que las medias de absorbancia alta están generadas por las sustancias 1, 2, 3 y las de absorbancia baja se generarían por la 4 y 5.

Efectos del diseño

Sustancia	Efectos	Lim inf	Lim Sup	Tipo
1	1,137683	0,501457	1,77391	Positivo
2	0,92146	0,285234	1,55769	Positivo
3	0,645206	0,00898	1,28143	Positivo
4	0,387377	-0,24885	1,0236	Nulo
5	-0,14325	-0,77948	0,49298	Nulo

Complementando el análisis anterior, se ve que las sustancias 1, 2 y 3 aportan positivamente al aumento de la absorbancia, siendo mayores los efectos en la 1 y 2.

Potencia del diseño

La potencia tiene como fin estimar la capacidad de acertar del diseño, de acuerdo a: las medias, nivel de significancia y el MSE.

Sustancia	Medias log(abs)	Medias reales de absorbancia
1	-3,445952	0,03187
2	-3,760087	0,02328
3	-4,892604	0,0075
4	-4,984674	0,00684
5	-5,22628	0,00537

La potencia es de 99,84% y nos indica que en este porcentaje nuestro diseño tiene la capacidad de acertar, lo cual es muy bueno para el experimento y sus conclusiones.

Conclusiones

Fue altamente confiable realizar este diseño, el bloque fue útil incorporarlo al modelo y se encontraron niveles óptimos de absorbancia. Por último se demostró las sustancias 1, 2 y 3 mostraron adecuados resultados, las otras sustancias no mostraron adecuados resultados en el experimento.

Todo esto permite decir que para que la enzima se disminuya o sea más lenta su velocidad en el pardeamiento de las frutas, disminuyendo el daño en la maduración, y mejorando condiciones de almacenamiento, transporte y calidad final de los productos naturales exportables, se le pueden inyectar las sustancias 1, 2 principalmente, o la 3, logrando así que se disminuya la cantidad de sustrato y por ende la velocidad de consumo de pardeamiento de la fruta, y puedan tener larga duración.

Referencias

1. Baena A, Salazar J.C. (2009). Análisis y Diseño de Experimentos aplicados a estudios de simulación. Dyna, Año 76, Nro. 159, pp. 249-257. ISSN 0012-7353. Medellín, Septiembre.

2. Calvo M. Bioquímica de los alimentos. Tirosinasa.. [En línea] < Disponible: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>> [Consulta: septiembre 17, 2008]
3. Erhan Astarci. (2003). Production and Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from *Thermomyces Lanuginosus*.
4. Fenoll, Lorena G. et al. (2002) . Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34 332–336
5. Izquierdo, José Felipe; Cunill, Fidel y otros. Cinética de las reacciones químicas. Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona. 2004. Pág 269
6. Lee, M. (2007). Inhibitory efecto of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. En *Food Chemistry*. Vol 102, p. 146-149.
7. Marshall, Maurice; Kim, Jeongmok y Cheng, Wei. (2000). Enzymatic Browning in fruits, vegetables and Seafoods. FAO.
8. Valencia, M. Notas de curso. (2011). Análisis y Diseño de experimentos. En <http://digi-campus.upb.edu.co/moodle/>.