



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

**DISEÑO DE UN EQUIPO PARA TRATAMIENTO POR PULSOS ELECTRICOS
DE ALTA INTENSIDAD Y SU INFLUENCIA EN LA EXTRACCIÓN DE
PIGMENTOS DESDE PULPA DE TOMATE**

Profesor Patrocinante:

Lilian Elizabeth Abugoch James

Departamento de Ciencia de los Alimentos y
Tecnología Química, Universidad de Chile

Directores de Memoria:

Lilian Elizabeth Abugoch James

Departamento de Ciencia de los Alimentos y
Tecnología Química, Universidad de Chile

Marco Antonio Bejar Vega

Departamento de Ingeniería Mecánica,
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas,
Universidad de Chile

ANDRÉS LUIS GLATZEL ZUÑIGA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS
Santiago de Chile, 2012

"Puede que no haya ido a donde quería ir, pero creo que he terminado donde tenía que estar."

D. A.

Agradecimientos a toda la gente que apoyó este proyecto de investigación y creyó en él, en particular a mi familia y a Paula por el cariño y paciencia y a Lilian por la gestión.

También agradezco a toda una comunidad de gente conectada alrededor del mundo, los cuales sin mayor interés que el de ayudar a otros, comparten su conocimiento.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 ANTECEDENTES GENERALES DEL PROCESO	5
1.2 MECÁNICA DE FUNCIONAMIENTO DEL PROCESO	5
1.3 MODELACIÓN MATEMÁTICA DEL PROCESO	6
1.4 INFORMACIÓN GENERAL SOBRE CAROTENOIDES Y SU EXTRACCIÓN	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
2.1 HIPÓTESIS	14
2.2 OBJETIVO GENERAL	14
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. CONSTRUCCIÓN Y PUESTA EN MARCHA EQUIPO	15
3.1 CONSIDERACIONES DE DISEÑO DEL EQUIPO	15
3.2 RESULTADOS DISEÑO, CÁLCULO Y CONSTRUCCIÓN EQUIPO DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD	29
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL EQUIPO DE PULSOS ELÉCTRICOS	47
4. METODOLOGIA DE TRATAMIENTO POR PULSOS ELECTRICOS DE PULPA DE TOMATE PARA ANALISIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES.....	56
4.1 METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE PULPA DE TOMATE FRESCA	56
4.2 METODOLOGÍA DE TRATAMIENTO POR PULSOS ELÉCTRICOS PARA MICROSCOPIA	57
4.3 METODOLOGÍA PARA TRATAMIENTO POR PULSOS ELÉCTRICOS PARA ABSORBANCIA	59
4.4 METODOLOGÍA PARA EXTRACCIÓN CON SOLVENTE DE PIGMENTOS CAROTENOIDES	59
4.5 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA UV-VIS	62
5. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS TRATADAS POR PULSOS ELÉCTRICOS.....	63
5.1 RESULTADO DE OBSERVACIONES EN MICROSCOPIA ÓPTICA PARA DETERIORO CELULAR EN PROCESO DE PULSOS ELÉCTRICOS	63
5.2 RESULTADOS DE CUANTIFICACIÓN COMPARATIVA DE EXTRACCIÓN CON SOLVENTE DE PIGMENTOS CAROTENOIDES EN MUESTRAS TRATADAS POR PULSOS ELÉCTRICOS.....	68
6. CONCLUSIONES	77
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8. MATERIAL ANEXO.....	83

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue diseñar, calcular y fabricar un equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad a escala de laboratorio para ser utilizado en tratamientos de alimentos fluidos. El equipo resultante permite tratar “batches” de 50ml de muestra fluida a intensidades de campo entre 1-15 kV/cm mediante pulsos de decaimiento exponencial, siendo posible regular los periodos entre descargas. La operación del equipo permite seleccionar el tipo de descarga, entre pulsos monopolares y bipolares y la simetría entre tiempos de descarga en el caso de pulsos bipolares.

El equipo se utilizó para pretratamiento en la extracción de pigmentos carotenoides provenientes de pulpa de tomate fresca (*Lycopersicon esculentum*, variedad ‘limachino’) a intensidades de campo de 5 Kv/cm con pulsos bipolares cada 5 s, evaluar los rendimientos de extracción de los pigmentos y observar a nivel celular los cambios producidos por el tratamiento de los diferentes niveles de pulsos eléctricos aplicados.

Se obtuvo como resultado del tratamiento de pulsos eléctricos de alta intensidad sobre la pulpa de tomate un aumento notorio del rendimiento acorde se aumenta el número de pulsos, con incrementos en la concentración de pigmentos carotenoides en el extracto orgánico de $14\pm 2\%$, $40\pm 4\%$, $60\pm 6\%$ para 400, 800 y 1600 pulsos de pretratamiento expresados como aumento porcentual en los ‘peaks’ de absorbancia UV-Vis entre 350-500 nm para carotenoides.

Mediante microscopia óptica se observaron efectos de debilitación progresiva de la membrana celular y de formación de aglomerados celulares compactos los cuales en conjunto facilitaron la ruptura celular irreversible por compresión de membranas debilitadas y esta observación podría ser una explicación a la mejora en rendimiento porcentual cercana a los 800 pulsos eléctricos de pretratamiento aplicado.

SUMMARY

DESIGN AND MANUFACTURE OF A HIGH INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD EQUIPMENT AND THEIR INFLUENCE IN CAROTENOID PIGMENT EXTRACTION FROM TOMATO PULP

The aim of this research was to design and manufacture a high intensity pulsed electric field (HIPEF) equipment capable of treating small fluid food samples at laboratory scale. The resulting equipment can treat 50 ml batch samples at field strengths between 1-15 kV / cm with exponential decay pulses, with the ability to adjust discharge parameters such as intensity, polarity, period and symmetry of the discharged pulses.

The HIPEF technique was used as a pretreatment aiding the extraction of carotenoid pigments from fresh tomato pulp (*Lycopersicon esculentum*, 'limachino' variety) at field strengths of 5 kV / cm using bipolar pulses every 5 s, evaluating the extraction yields via UV/VIS absorbance and cellular deterioration at different amount of electrical pulses applied.

As result it was found that using HIPEF as pretreatment in solvent carotenoid extraction increased yields proportional to the number of pulses applied, with increments of dissolved pigments in organic extract of $14 \pm 2\%$, $40 \pm 4\%$, $60 \pm 6\%$ for 400, 800 and 1600 pulses applied expressed as percentual increase in UV-Vis absorbance peaks for carotenoids between 350-500 nm.

Progressive cell membrane deterioration and internal rearrangement was observed over optical microscopy according the increased ammount of pulses, highlighting the formation of cell agglomerates on treatments with the higher applied number of pulses (800-1600) which could explain the higher energy efficciency of the extraction near the 800 pulses margin, by compressing weakened cell membranes untill breakdown at the center of the agglomerates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales del proceso

El tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad consiste en un método de ruptura de membrana celular el cual puede ser reversible o no dependiendo de la intensidad y periodo del campo aplicado. Lo que resulta novedoso de la técnica es su mecanismo de acción el que se basa en principios eléctricos capacitivos y no a un efecto resistivo por lo cual se intenta evitar el efecto de calentamiento óhmico.

Las aplicaciones de la microporación celular mediante pulsos eléctricos de alta intensidad en el área de alimentos son diversas y a la fecha se encuentran en extensa investigación tanto a nivel de laboratorio como a nivel de planta piloto, entregando desafíos tanto en el área de diseño y escalamiento de los equipos como en sus aplicaciones potenciales, beneficios y limitaciones. Entre sus usos en estudio se pueden mencionar la inactivación microbiológica a temperatura ambiente (Sampedro y cols., 2007), la extracción de compuestos intracelulares de interés como pigmentos, antioxidantes o cadenas de ácidos nucleicos (Guderjan y cols., 2003) y la microencapsulación in-vivo en organismos unicelulares (Shi y cols., 2006).

1.2 Mecánica de funcionamiento del proceso

Exponer una célula a un campo eléctrico de alta intensidad (kV/cm) en pulsos de muy pequeña duración genera la formación de pequeños poros en su membrana, a mayor intensidad del campo, mayor es el tamaño del poro hasta que la ruptura de la pared celular se vuelve irreversible. A este fenómeno se le conoce por el nombre de electroporación y sus primeras referencias datan a la década de 1960 con investigadores como Doevenspeck (1960) al cual se le otorgó una patente por usar pulsos de alta intensidad para descontaminación microbiológica y a Sale y Hamilton (1967,1968) los cuales establecieron los fundamentos para la tecnología de pulsos eléctricos.

1.3 Modelación matemática del proceso

Pese a que el mecanismo de acción no se comprende del todo hasta la fecha, el modelo más aceptado es el propuesto por Zimmermann y cols. (1974) el cual propone un efecto de “ruptura dieléctrica” de las membranas. El modelo menciona que existe en forma natural entre una célula con su medio externo un gradiente electroquímico expresado como voltaje que por lo general bordea los valores de 0,1 V y esta relacionado al intercambio iónico de bombas en la membrana celular, a este potencial se le conoce como potencial de transmembrana ($\Delta\phi$). Si se considera a la membrana celular como un dieléctrico de baja permitividad debido a su composición mayoritariamente apolar (fosfolipídica), y las soluciones que la rodean como electrolíticas e independientes (liquido intracelular y extracelular). Al aplicar un campo eléctrico externo al sistema, los iones al interior de la célula migran paralelo al campo eléctrico, generando una gradiente de concentración iónica al interior de la célula la cual es mayor en la cercanía de la membrana. Efecto de lo anterior se genera la polarización de la célula en forma paralela y de signos opuestos al campo eléctrico aplicado. Zimmerman (1976) propuso que esta polarización inducida al interior de la célula también modifica el potencial de transmembrana ya que existen distintas concentraciones iónicas a lo largo de la pared. Para esto definió el potencial de transmembrana para un tiempo y punto de la membrana determinado como:

$$\Delta\phi(t,E,M) = -F\varepsilon_m E r_c \cos\alpha (M)[1-\exp(-t/\tau_m)]$$

Ec. 1.1

Donde:

$\Delta\phi$: Potencial de transmembrana

M: punto de interés en la membrana

F: factor de forma

E: potencial eléctrico aplicado entre el interior y exterior de la célula

r_c : radio mínimo de la célula

α : ángulo de incidencia definido como la diferencia entre la dirección del campo eléctrico aplicado y M

t: tiempo transcurrido desde la aplicación del campo eléctrico

ϵ_m (F/m): permitividad relativa de la membrana, depende de la conductividad del medio externo, interno e intrínseco de la membrana como también del radio celular [$\epsilon_m = F(\sigma_e, \sigma_i, \sigma_m, r)$].

τ_m (s): constante de relajación de membrana, asociada al tiempo de distribución de carga eléctrica en la membrana.

Si se asume que el tiempo de distribución de la carga en la membrana es mucho menor a la duración del pulso eléctrico ($\tau_m \gg t$) y que la membrana se comporta como un dieléctrico puro ($\epsilon_m = 0$) la expresión se simplifica a:

$$\Delta\phi = FE r_c \cos\alpha$$

Ec. 1.2

Sabiendo que en el área de la membrana celular cercana a los polos el gradiente de potencial es el máximo, lo cual se representa como $\cos\alpha = 1$, se obtiene que:

$$\Delta\phi_{\max} = FE r_c$$

Ec. 1.3

Siendo:

F=1,5 para células esféricas

r_c : radio celular

Para células elongadas se puede definir como:

$$\Delta\phi_{\max} = FE l_{\min}$$

Ec. 1. 4 (Grahl y Markl,1996)

Siendo:

$F = l / [l - (d / 3)]$ para células ovaladas o elongadas (Barbosa y cols., 2005)

l : longitud de la célula

d : diámetro de la célula

l_{\min} : longitud mínima paralela al campo eléctrico

Estas formulas describen un aumento en el potencial de transmembrana proporcional al campo eléctrico aplicado, al tamaño y a la forma celular.

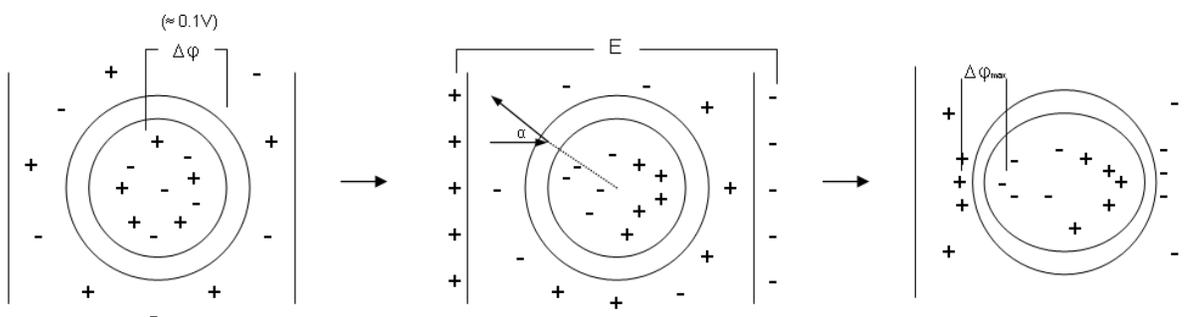


Figura 1.1: Mecanismo de polarización y aumento localizado del potencial de transmembrana

Un aumento del potencial de transmembrana generado por la polarización genera atracción de los iones de polo opuesto en el exterior de la membrana. Estas atracciones generan presiones de compresión contra la membrana disminuyendo su espesor (ver figura 1.1), si se aumenta el potencial hasta un valor critico se sobrepasa el nivel máximo de compresión que soporta la membrana generando su ruptura. Esto se expresa en la formula anterior como:

$$\Delta\phi_c = 1.5E_c r_c$$

Ec. 1.5

Donde:

$\Delta\phi_c$: Potencial de transmembrana crítico

E_c : Campo eléctrico crítico de ruptura

r_c : Radio crítico

Esto es un análogo a lo que ocurre en un condensador de placas, ya que se polariza a cada lado del dieléctrico con cargas opuestas de una magnitud equivalente al voltaje ($F=C/V$) produciendo atracción entre ellas, estas atracciones al superar la tensión eléctrica máxima dada por la permitividad del dieléctrico ocurre la ruptura en forma de un arco. En el caso de las células se ven involucrando efectos electroquímicos y no solamente eléctricos, por lo que en la ruptura se generan pequeños poros en la membrana celular los que permiten el intercambio iónico entre las soluciones hasta su equilibrio. Si la diferencia en el potencial de transmembrana no es mucho mayor a la de ruptura crítica, se generan pequeños poros lo cuales son reversibles, en caso contrario si el potencial es mucho mayor, se generan poros de grandes dimensiones los cuales destruyen la integridad de la célula haciendo la ruptura irreversible como de muestra en la figura 1.2.

El potencial de transmembrana crítico ($\Delta\phi_c$) es cercano a 1 V para mucho de los tipos más comunes de células (Ho y Mittal, 1996) (Zimmermann, 1986)

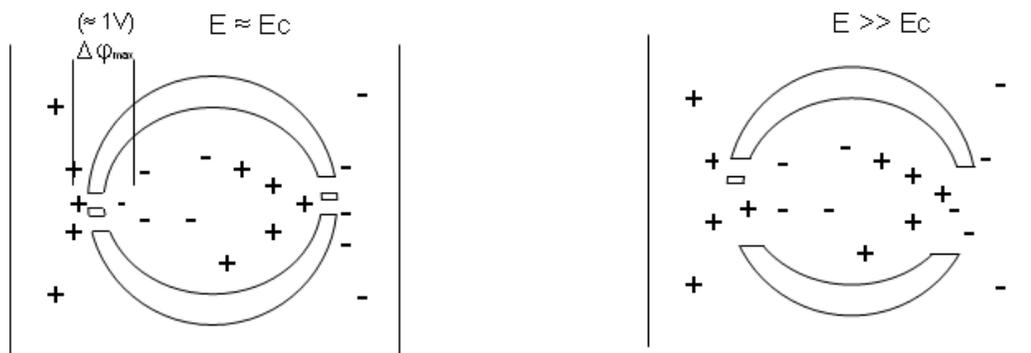


Figura 1.2: Mecanismo de ruptura reversible (izq.) e irreversible (der.)

1.4 Información general sobre carotenoides y su extracción

Existe una marcada tendencia en el último periodo por parte de los consumidores de informarse sobre los alimentos que se consumen, buscando en él propiedades benéficas o minimizar sus posibles efectos adversos a la salud.

Esto, junto con políticas y normativas de alimentación saludable por parte de las instituciones gubernamentales y de salud, han marcado a nivel industrial un cambio en torno al uso y elección de los aditivos alimentarios. Existe una tendencia a minimizar la cantidad de aditivos utilizados y entregar preferencia a aditivos de origen natural o idénticos al natural e idealmente con propiedades específicas apuntadas hacia una alimentación más saludable e inocua. (ProChile, 2009).

En este campo es donde los pigmentos carotenoides tienen una gran importancia, ya que cumplen con estos requisitos industriales y de consumidor en el área de colorantes naturales, tanto por su capacidad antioxidante, como por sus colores brillantes.

Los carotenoides son una familia de moléculas de origen natural muy extendidos. Se encuentran principalmente en plantas tanto terrestres como acuáticas, pero también se han encontrado en bacterias, hongos, levaduras y animales invertebrados. Universalmente se alojan en los cloroplastos de todas las plantas y algas superiores (Arandiga y cols., 2008)

Molecularmente, los carotenoides son tetraterpenoides (terpenoides con 40 átomos de carbono), y se pueden clasificar en dos grupos: los carotenos formados por hidrógeno-carbono y las xantofilas, formadas por carbono, hidrógeno y además oxígeno (ver figura 1.3). Los carotenoides son los responsables de la gran mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos presentes en los alimentos vegetales, y también de los colores anaranjados de varios alimentos animales.

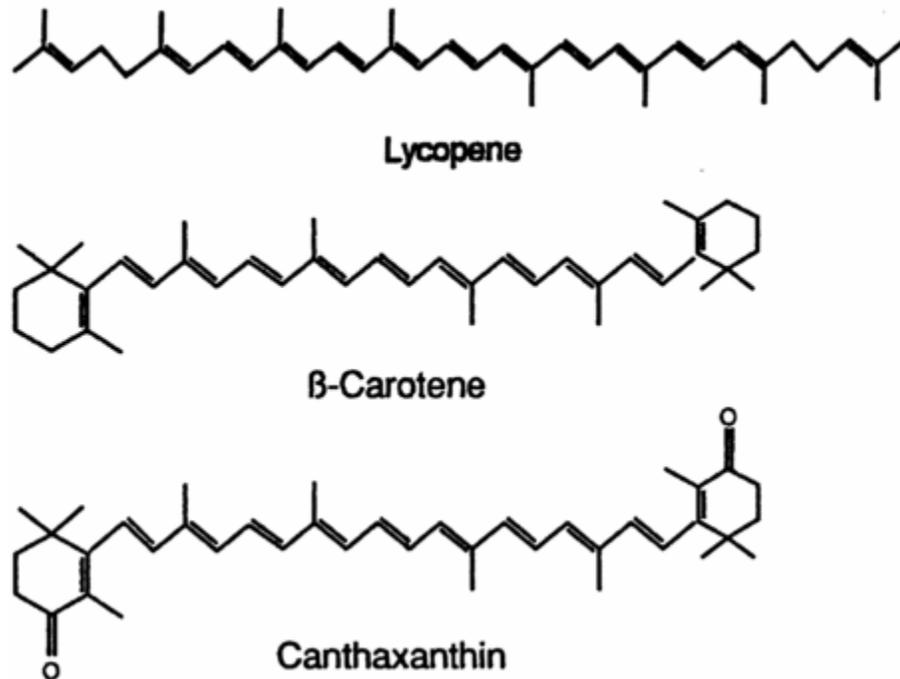


Figura 1.3: Algunos ejemplos de carotenoides

Fisiológicamente los carotenoides se involucran en la reacción de fotosíntesis de dos maneras: Primero, sirven como estructura secundaria de cosecha de energía mediante su mecanismo de degradación por fotólisis, función primordial de las xantofilas, pero su rol principal y de importancia es la de agente protector ya que sirven de captador de radicales libres formados por la excitación de la clorofila en su reacción con la luz, los cuales de no existir tendrían efectos adversos en la membrana celular y otras moléculas de la célula vegetal (Wolinsky, 2001). Existen 750 carotenoides diferentes que han sido aislados desde fuentes naturales, de los cuales alrededor de 500 se han caracterizado químicamente.

En frutas y vegetales existe una degradación selectiva de los organelos en algunas áreas de la planta, con lo que se pierde localmente la habilidad de producir clorofila, pero se sintetiza una variedad de pigmentos carotenoides muy particulares. A esto se atribuye el cambio de color en frutos y semillas de los vegetales y sirve para su ciclo reproductivo utilizando esta coloración llamativa de los pigmentos para atraer animales que consuman su fruto o semilla, lo cual beneficia el transporte activo de las semillas (Wolinsky, 2001).

Uno de estos pigmentos es el licopeno, el cual es responsable del característico color rojo de los tomates maduros y sus productos derivados como también es responsable del color rosa de las sandias. Ha recibido mucha atención en el último periodo debido a su posible efecto benéfico en la prevención de enfermedades derivadas de la degeneración celular, gracias a su acción captadora de radicales libres y largos tiempos de residencia en tejidos específicos del ser humano (Gerster, 1997). El licopeno es una molécula que posee 11 dobles enlaces conjugados lo cuales se encuentran de forma natural en su conformación trans, sin embargo la exposición a altas temperaturas o luz en su espectro de absorción característico induce a alguna de sus distintas conformaciones cis las cuales poseen una menor estabilidad química y tienden a degradarse en mayor proporción que su conformación trans en el tiempo por interacción con otras moléculas, en particular oxidantes. El licopeno posee *propiedades* únicas por su cadena acíclica, gran hidrofobicidad, su gran número de dobles enlaces conjugados y pigmentación llamativa (Wolinsky, 2001). (ver figura 1.4).

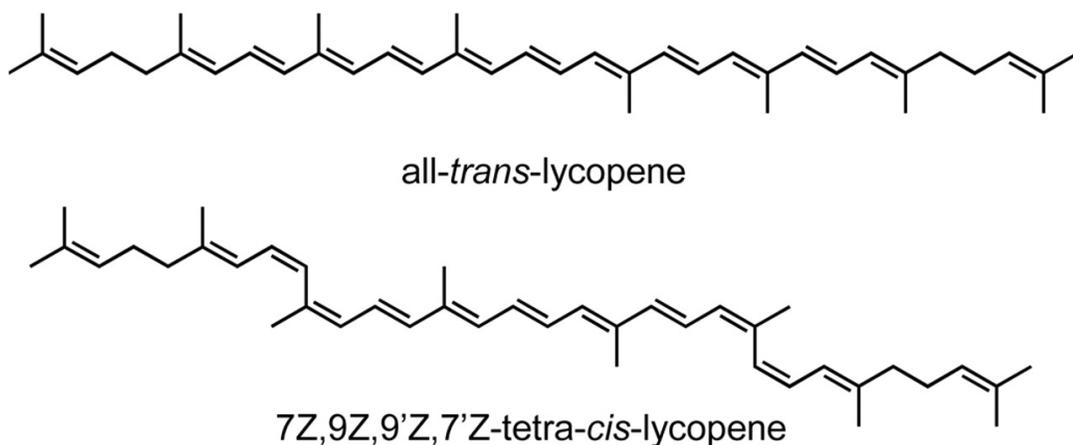


Figura 1.4: Licopeno en sus conformación Trans y una de sus conformaciones Cis

En la industria, la extracción de pigmentos carotenoides desde la célula, incluyendo el caso particular el licopeno, se efectúa tradicionalmente mediante la ruptura de la pared celular por altas temperaturas en un medio acuoso (100-140 °C) y posterior separación del pigmento por difusión entre fases mediante

solventes orgánicos apolares y la fase acuosa, con la posterior evaporación de la fase orgánica para la recuperación del pigmento (Cardona y cols., 2006). También existen técnicas promisorias en estudio de extracción mediante CO₂ supercrítico, encontrándose en la fase de planta piloto, pero sigue siendo un sistema de extracción con costos elevados a nivel de infraestructura (Cirulia y cols., 2009).

Los costos energéticos y de solvente, así como la estabilidad de la molécula de licopeno en los procesos tradicionales de extracción (altas temperaturas) genera una problemática en torno a la extracción industrial del pigmento, ya que pese a haber sido demostrado que mediante los procesos térmicos a alta temperatura se obtiene una mayor biodisponibilidad funcional para el ser humano, debido a la transformación térmica del licopeno de su conformación cis a trans (Cardona y cols., 2006), rápidamente pasado este cambio conformacional ocurre la degradación del pigmento por oxidación catalizados por la alta temperatura, provocando pérdidas de hasta el 70% del pigmento en el caso de tratamientos a alta temperatura para la inactivación microbiológica y ruptura celular a temperaturas elevadas (100-140 °C) (Chen, 2009).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Es posible el diseño de un equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad, y utilizarlo para pretratamiento de pulpa de tomate, aplicando pulsos eléctricos de alta intensidad combinado con extracción por solvente a temperaturas moderadas, y mediante esta metodología se podrán liberar los pigmentos carotenoides de las células y obtener un método alternativo con mayor rendimiento y calidad al método tradicional de obtención de pigmentos carotenoides basado en altas temperaturas y solvente para su uso como colorante en la industria de alimentos.

2.2 Objetivo General

Diseñar, calcular y construir un equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad (HIPEF) a escala de laboratorio capaz de tratar muestras líquidas en los rangos de 1-15 kV/cm, tomando en cuenta el dimensionado, diseño eléctrico y cálculos relacionados a la fabricación y puesta en marcha del equipo.

Aplicar un tratamiento HIPEF como preproceso en la extracción con solvente de pigmentos carotenoides desde pulpa de tomate y observar mediante microscopia los efectos del proceso a nivel celular, como también cuantificar los cambios en los rendimientos de extracción.

2.3 Objetivos Específicos

- § Investigar factores a considerar para el diseño del equipo HIPEF propuesto.
- § En base a las elecciones de diseño, calcular, dimensionar y seleccionar las partes del equipo.

- § Determinar un proceso de extracción estandarizado de carotenoides desde la pulpa mediante solventes orgánicos y lograr hacer una cuantificación comparativa entre muestras.
- § Estudio de los mecanismos de acción del tratamiento en las células de la pulpa de tomate mediante microscopia.
- § Estudio de la efectividad del proceso HIPEF para la extracción de licopeno seguido de la extracción por solvente a temperatura ambiente.
- § Optimizar parámetros de extracción tanto para HIPEF como extracción con solvente para obtener el máximo rendimiento.

3. CONSTRUCCIÓN Y PUESTA EN MARCHA EQUIPO

Tomando en cuenta que esta memoria tiene dos aspectos diferentes entre si se va a dividir esta sección en lo referente al diseño de equipo y la aplicación de extracción de carotenos totales desde pula de tomate

3.1 Consideraciones de Diseño del equipo

Pese a que existen algunas variaciones en el diseño, un equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad consta en la mayoría de los casos de cinco etapas generales: Un generador de alto voltaje, una etapa acumuladora de carga, un sistema de control para voltaje y descarga, un sistema de monitoreo y la celda de tratamiento y por lo general se conectan acorde al diagrama presentado en la figura 3.1.

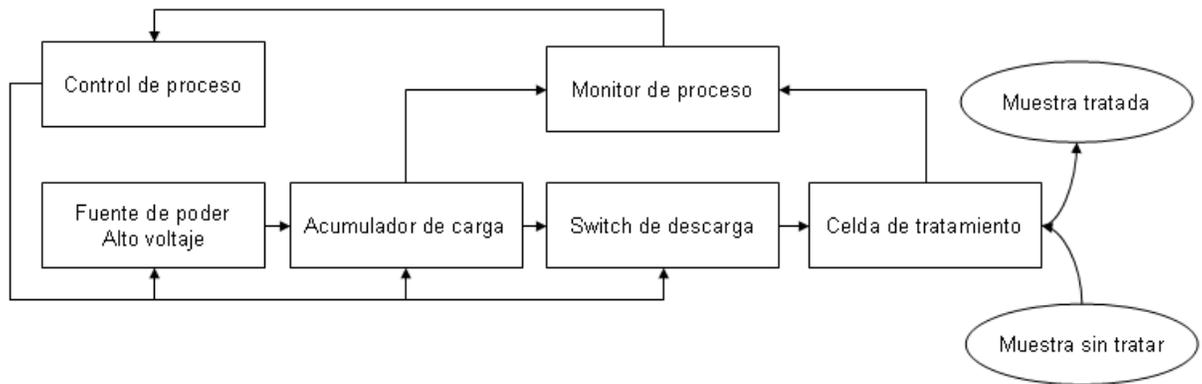


Figura 3.1: Diagrama general de los componentes de un equipo HIPEF

Es el objetivo de esta primera parte es definir los parámetros operacionales y la selección de los componentes para cada etapa.

3.1.1 Intensidad de campo eléctrico:

En estudios sobre inactivación de microorganismos mediante PE realizados por Sale y Hamilton (1968), se midieron los efectos de la temperatura, concentración iónica, potencial eléctrico, corriente y energía total aplicada. El efecto más importante resultó ser el potencial eléctrico, demostrando que existe un potencial mínimo para que el tratamiento sea efectivo y existe una posterior letalidad exponencial acorde se incrementa el voltaje. Posteriormente Zimmerman (1976) propuso el modelo de ruptura dieléctrica asociado al potencial de transmembrana, tamaño y geometría de la célula y en estudios como el de Ho y Mittal (1996) cuantificaron el efecto de potencial de transmembrana crítica de ruptura cercano a 1 V para la mayoría de las células.

Sabiendo que los tamaños para células vegetales se encuentran en el rango de 100-200um y los microorganismos unicelulares dentro del rango de 1-10um (Barbosa-Cánovas, 1999). Se requiere calcular el voltaje de operación para el equipo tal que supere el umbral mínimo de funcionamiento.

Calculo de voltaje requerido

Asumiendo que la muestra es homogénea en torno a su conductividad, se puede definir la intensidad promedio del campo eléctrico como:

$$E = V/d$$

Ec. 3.1

Donde:

E: Intensidad de campo eléctrico aplicado

V: Voltaje medido en los electrodos

d: distancia de separación entre electrodos

Utilizando la formula propuesta por Zimmermann (1976) (Ec1.5) se puede calcular el voltaje requerido en los electrodos como un múltiplo del diámetro de la célula a tratar mediante la ecuación:

$$E_c = \Delta\phi_c / 1,5r_c$$

Donde:

$\Delta\phi_c$: Potencial de transmembrana crítico

E_c : Campo eléctrico crítico de ruptura

r_c : Radio critico

$\Delta\phi_c$ se estima como 1 V para que ocurra microporación acorde a Zimmermann (1976) y r_c se estima según el radio promedio celular suponiendo células esféricas.

Para células vegetales de 100um de diámetro:

$$E_c = 1[V] / 1,5 * 5 \times 10^{-3} [cm]$$

$$E_c = 133 [V/cm]^*$$

Para microorganismos pequeños de 1um de diámetro (ej: s. aureus):

$$E_c = 1[V] / 1,5 * 5 \times 10^{-5} [cm]$$

$$E_c = 13333 [V/cm]^*$$

(*en ambos casos se asume una separación de 1 cm entre electrodos y un campo eléctrico homogéneo en intensidad a lo largo de la muestra)

Esta intensidad del campo eléctrico calculada entre **electrodos equidistantes a lo largo de toda la superficie de contacto con la muestra**, junto con asumir una conductividad homogénea de muestra, permite estimar los voltajes aplicados a nivel celular, ya que el voltaje a nivel celular es una fracción del voltaje total aplicado entre electrodos, proporcional a la fracción de distancia paralela al campo eléctrico ocupada por la célula (ver figura 3.2).

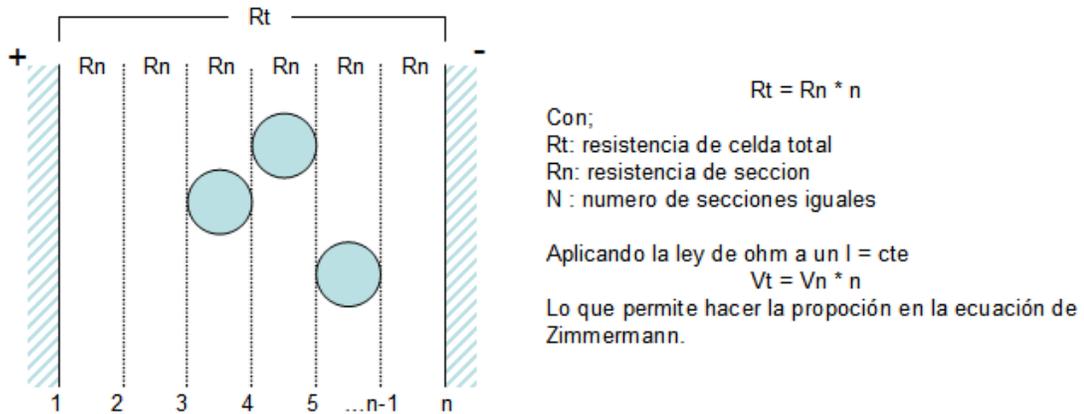


Figura 3.2: Relación entre voltaje aplicado a los electrodos y secciones del tamaño de la célula a tratar en la celda.

En base lo planteado y a referencias experimentales realizadas en tejidos vegetales y organismos unicelulares por diversos estudios (Lebovka y cols., 2005) (Guderjan y cols., 2004) (DeVito, 2006) **se seleccionó un rango de potencial eléctrico para el equipo entre 1 y 15 kV/cm ajustable**, ya que permite la investigación tanto en células vegetales (100-200 μm) como en organismos unicelulares (1-10 μm) trabajando con un margen superior al mínimo calculado para obtener ruptura dieléctrica, logrando así trabajar en el rango de ruptura irreversible de las paredes celulares.

3.1.2 Periodo de los pulsos:

Para seleccionar el período de pulsos eléctricos (PE), se debe considerar que pese a que la corriente aplicada no implica un factor de importancia en los fenómenos de electroporación, si lo es en el efecto secundario de calentamiento óhmico en la muestra. Si se considera a la muestra como una solución de

conductividad homogénea, se puede describir a la energía aplicada al sistema en el tiempo como:

$$W_{(t)} = \int_0^t V(t)I(t)dt$$

Ec. 3.2

Donde:

$W_{(t)}$: Potencia en función del tiempo

$V_{(t)}$: Voltaje en función del tiempo

$I_{(t)}$: Corriente en función del tiempo

Esta energía se expresa en la muestra principalmente en forma de calor y se deben tomar precauciones para que se disipe al medio ambiente antes de aumentar la temperatura de la muestra a niveles no deseados.

La energía aplicada dependerá de la conductividad de la muestra, el voltaje aplicado en los electrodos y la capacidad de descarga del equipo en el tiempo. Estos a su vez dependen de la geometría de la celda, el volumen de muestra a tratar, la etapa generadora y de acumulación de carga del equipo, lo que hace difícil su manejo en forma teórica. En la práctica para su regulación se utilizan loops de control proporcional o sistemas PID acorde a la temperatura de la muestra, controlando el periodo de los pulsos aplicados o un sistema refrigerante activo en la celda, se opta por el primer método de control debido a que un sistema de refrigeración activa aumenta la complejidad de la celda ya que debe ser un sistema aislado eléctricamente del equipo.

3.1.3 Cantidad de pulsos:

El aumentar el número de pulsos totales de tratamiento, en particular cuando se trabaja cercano al potencial crítico de ruptura, incluso a valores un poco menores, genera un aumento en la formación de rupturas en las membranas celulares. Se plantea que esto se debe al deterioro gradual de la membrana por tensiones repetitivas y a que los periodos de los pulsos son menores a los tiempos que demoran las cargas iónicas en volver al equilibrio. Es

por este motivo que se propone estudiar este efecto mediante microscopía en el tejido de la pulpa de tomate.

3.1.4 Forma y polaridad de los pulsos:

En un equipo de pulsos eléctricos se debe acumular energía en un banco de condensadores los cuales posteriormente se descargan sobre la celda de tratamiento a un voltaje dado. Esto debido a que las fuentes de alimentación de alto voltaje entregan por lo general una baja corriente de descarga continua.

Según la literatura se utilizan valores de capacitancia en el rango de 0,1 a 10 uF (DeVito, 2006) los que se relacionan directamente con la energía aplicada a la muestra mediante la formula:

$$E = \frac{C * V^2}{2}$$

Ec. 3.3

Donde:

E = Energía potencial almacenada [J]

C = Capacidad [F]

V = voltaje entre los terminales del condensador [V]

El voltaje de descarga para este tipo de circuitos en el tiempo se puede definir como:

$$V_{(t)} = V_o * e^{-(t/\tau)}$$

Ec. 3.3 (Gongóra-Nieto et al, 2002)

con:

$V_{(t)}$: Voltaje en el tiempo

V_o : Voltaje inicial de la descarga (máximo)

t: tiempo

τ : Constante de tiempo para decaimiento ($\tau = RC$)

R: Resistividad de la celda

C: Capacitancia en circuito acumulador

Esto describe un decaimiento exponencial del voltaje en la celda acorde pasa el tiempo, lo cual inserta una nueva problemática ya que al avanzar el decaimiento del pulso existe un punto en el cual se encuentra bajo el umbral de voltaje efectivo para un tratamiento por electroporación, transfiriendo la energía restante a la muestra en forma de calor mediante calentamiento óhmico. En base a esto se puede definir un valor de tiempo de decaimiento crítico (t_c) para el proceso, en el cual superado este valor el pulso de descarga ya no es útil para electroporación (ver figura 3.4)

$$V_c = V_o * e^{-(t_c/\tau)}$$

Ec. 3.4

con:

V_c : Voltaje mínimo de ruptura dieléctrica

V_o : Voltaje inicial de la descarga (máximo)

t_c : tiempo critico efectivo de descarga

τ = Constante de tiempo para decaimiento ($\tau = RC$)

Existen dos soluciones para minimizar este problema, el primero y el más mencionado en la literatura consiste en reemplazar el condensador de descarga por una escalera de circuitos LC, lo que genera ondas pseudocuadradas a la salida mejorando el valor de t_c para el pulso, disminuyendo efectivamente el calentamiento de la muestra y a su vez mejorando la efectividad del tratamiento (DeVito, 2006) (en figura 3.3 ver diferencias entre circuito RC de decaimiento exponencial y circuito LC de decaimiento pseudocuadrado) (en figura 3.4 ver diferencia entre pulso de decaimiento exponencial y pulso pseudocuadrado). El problema es que el valor de impedancia del circuito LC (Z) debe ajustarse al mismo valor que la resistividad de la celda para obtener un circuito resonante y un pulso lo más cercano al cuadrado posible, esto en la práctica es muy difícil de lograr debido a la naturaleza variable de los alimentos y debido a que se requiere alterar los valores de inductancia o capacitancia sustituyendo

componentes, por lo que se utilizan resistencias en serie o paralelo con la celda para igualar la impedancia.

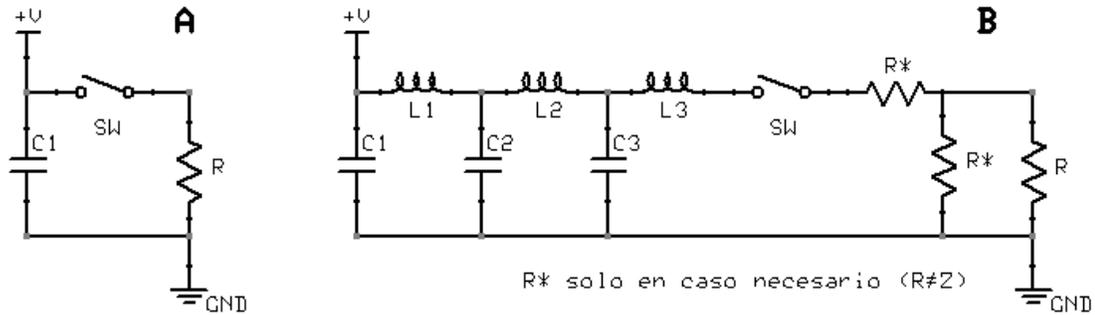


Figura 3.3: a) circuito RC b) circuito LC en cascada

Otra forma de evitar este efecto es limitando el tiempo de descarga al tiempo crítico del pulso o a un valor cercano, esto requiere mecanismos muy rápidos de interrupción cercanos a 1 ms., solo obtenibles mediante interruptores de estado sólido o sistemas mecánicos novedosos de interrupción por arco de plasma.

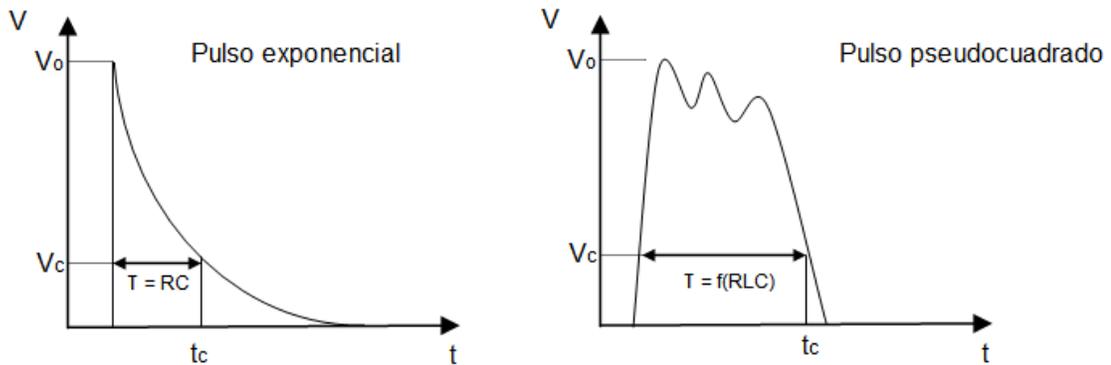


Figura 3.4: Pulso exponencial vs. pulso pseudocuadrado y su relación con t_c

Otro aspecto importante es la polaridad de los pulsos aplicados, estudios como el de la DeVito (2006) mencionan notables mejoras en la efectividad del proceso de electroporación si se cambia de un esquema de pulsos monopolares a bipolares (ver figura 3.5), y más aun si se disminuye el periodo entre pulsos de distinta polaridad a un mínimo. Esto concuerda con el modelo de ruptura dieléctrica propuesto por Zimmermann ya que si el periodo entre pulsos de distinta polaridad es menor al tiempo de relajación de la membrana (tiempo que demora en volver la membrana al equilibrio iónico), el potencial de

transmembrana se amplifica gracias al desequilibrio iónico previo, lo que pese a no haber datos concluyentes en la literatura si es efectivo o no en términos generales (DeVito, 2006) resulta efectivo cuando se trabaja a voltajes cercanos a los del potencial crítico de transmembrana (Chang, 1989) (Qin y cols., 1994). También otra ventaja de trabajar con pulsos bipolares es que contribuyen al menor desgaste electrolítico de los electrodos, ya que se alterna su polaridad en cada pulso.

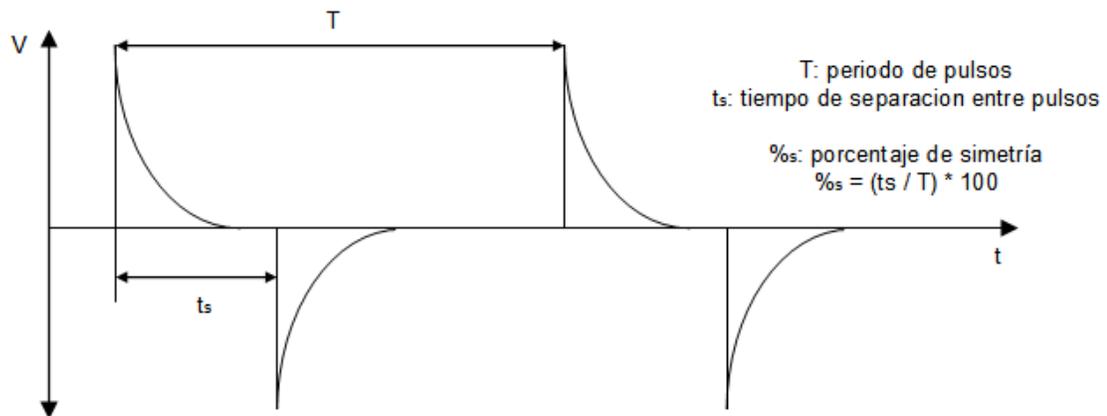


Figura 3.5: Periodo y simetría en pulsos bipolares de decaimiento exponencial.

En base a lo anterior y por la dificultad que involucra generar pulsos cuadrados, se trabajara con un diseño de equipo para pulsos de decaimiento exponencial ajustando en la etapa de interrupción la polaridad de los pulsos, su periodo y simetría. No descartando la posibilidad de modificación al incorporar a futuro un circuito de cascada LC.

3.1.5 Interruptor de descarga:

La generación de pulsos bipolares involucra a la etapa de interrupción de descarga. Para generar este tipo de pulsos en vez de utilizar un solo interruptor de descarga (figura 3.6a), se utiliza un arreglo de interruptores ya sea de estado sólido o mecánicos llamado puente H (figura 3.6b):

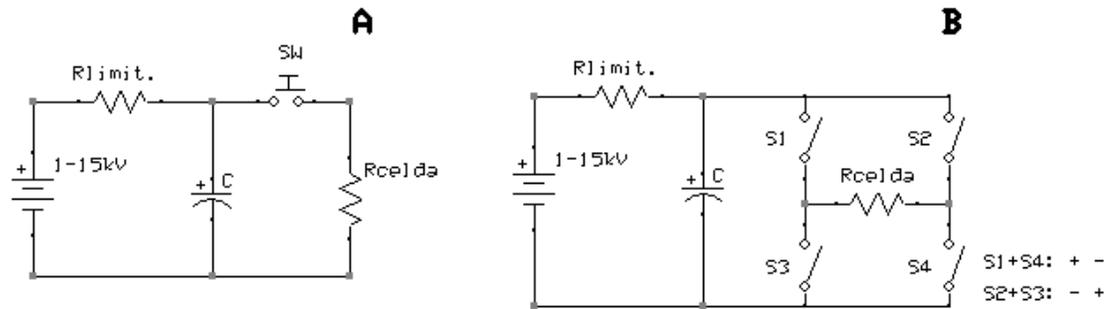


Figura 3.6: a) Circuito monopolar exponencial b) Circuito bipolar exponencial (Puente H)

Esto aumenta el número de interruptores a cuatro haciendo más complejo el equipo, pero permite cambiar la polaridad de la descarga a voluntad y entrega una mayor seguridad en caso de fallo de uno de los interruptores ya que siempre se requieren de dos interruptores activados para la descarga en la celda.

Se requiere de un interruptor capaz de soportar condiciones de trabajo en donde el aire ya no puede ser considerado un aislante a distancias cortas, también es deseable una velocidad rápida de interrupción y la posibilidad de invertir la polaridad de salida en el caso de utilizar pulsos bipolares. Pese a que en los últimos años han habido avances enormes en el campo de los semiconductores para alto voltaje como (IGBT, SCR) y poseen propiedades deseables en un equipo de pulsos eléctricos como su rápida velocidad de respuesta y la ausencia de desgaste mecánico (Fuji, 2004), aun siguen siendo una opción poco rentable a nivel de laboratorio, ya que para lograr las tensiones de descarga requeridas se deben utilizar un número considerable de unidades conectadas en serie debido a que sus potenciales máximos de trabajo se encuentran en la actualidad en el rango de 1-2 kV por unidad y en caso de fallo por sobrevoltaje se cortocircuitan, sobrecargando el resto de los semiconductores e induciendo un fallo en cascada de todos los componentes comprometiendo la integridad y seguridad del equipo. Pese a que hay formas de contrarrestar estos efectos y tiene sus beneficios en equipos de mayor volumen y uso prolongado (Won y cols., 2001), se prefiere buscar métodos alternativos para la interrupción.

El método más utilizado para gatillar la descarga en equipos de alto voltaje por su simplicidad de implementación se basa en la descarga por arco de plasma, que aprovecha la propiedad de ionización de los gases cuando se les aplica un alto voltaje, esto permite pasar de un estado de alta impedancia a uno de alta conductividad debido a la generación de arcos de plasma (ver figura 3.7a). Paschen (1889) definió la relación entre la distancia de dos electrodos y el gas circundante en un modelo matemático expresado como:

$$V = \frac{a(PD)}{\ln(PD) + b}$$

Ec. 3.5 (P. Duniway, 1889)

($a = 43,6 \times 10^6$ V/(atm·m) y $b = 12,80$ para aire a $P = 1$ atm, 50% HR)

Con:

V : Voltaje de ruptura dieléctrica [V]

P: Presión del gas o mezcla de gases [atm]

D: Distancia entre electrodos [m]

a: cte. del gas o mezcla [V/(atm·m)]

b: cte. del gas o mezcla

a y b son constantes propias de el gas o mezcla de gases que rodean los electrodos. Se obtienen a partir de su voltaje mínimo de ionización y su comportamiento ante la presión, es importante mencionar que estos valores también se ven afectados por el contenido de humedad en el gas. Si se considera $P = \text{cte.}$ al igual que los factores a y b los cuales dependerán físicamente del lugar donde se trabaje en el caso de ser un sistema abierto, se puede relacionar al voltaje de descarga como una función de la distancia entre los electrodos $V(d)$. Esto genera una ventaja, ya que ajustando la distancia entre dos electrodos uno puede obtener descargas acorde al potencial eléctrico que se desee pero también es un problema ya que descarta por completo el uso de interruptores mecánicos convencionales. Este mecanismo de disparo se ha implementado en equipos de investigación de PE monoplares con bastantes

buenos resultados (Knorr y cols., 2001) (Gachovska y cols., 2006). El problema surge cuando se desea controlar de forma independiente la carga almacenada y el periodo de disparo, como es el caso de los tratamientos con pulsos bipolares o asimétricos.

Para solucionar el problema de control de disparo a intervalos no constantes, existen dos métodos: en el primero se utilizan dos electrodos principales capaces de manejar altas corrientes y se incorpora un tercer electrodo de control de disparo más pequeño entre o dentro de uno de ellos, los electrodos principales tienen una separación suficiente como para no lograr ionizar el gas al voltaje de operación deseado, pero si se aplica un voltaje superior al de operación en el electrodo de control el gas se ioniza y se transforma en conductor, permitiendo el flujo entre los electrodos principales. Esta solución requiere de una segunda fuente generadora de alto voltaje como también de un circuito especializado para controlarlo, lo que aumenta el costo y complejidad del equipo (ver figura 3.7b). El otro método consiste en utilizar un interruptor electromecánico capaz de soportar los voltajes y corrientes de operación, para esto se debe tener en cuenta que la separación entre contactos debe ser mayor a la distancia de ruptura dieléctrica y se debe evitar el contacto directo entre los electrodos ya que esto provoca la fusión entre ellos debido a la alta temperatura generada por el plasma. Existen algunos modelos comerciales de relés al vacío los cuales evitan la ruptura dieléctrica, pero por lo general son efectivos hasta 4-5 kV y para corrientes de 100-500 mA y pierden el vacío al cabo de 1 o 2 años. Por lo que es mejor trabajar a condiciones de presión medioambiental.

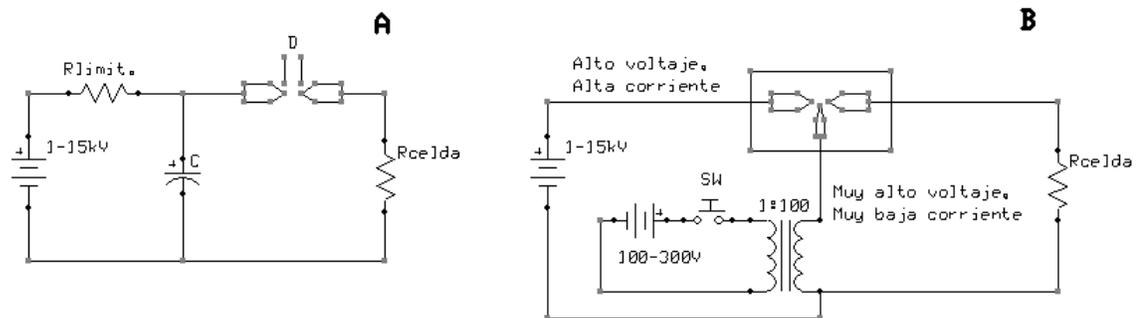


Figura 3.7: a) Circuito monopolar con interruptor por descarga simple, b) Circuito monopolar con interruptor mediante descarga controlada

Como es deseable que el equipo pueda trabajar con pulsos bipolares y con periodos entre pulsos ajustables, se optó por el diseño y fabricación de dos interruptores electromecánicos de dos posiciones cada uno (SPDT) similar en funcionamiento a un circuito de interrupción por descarga simple (figura 3.7a), pero con un electrodo móvil pivotante entre dos electrodos para utilizarlos en configuración de puente H, intentando minimizar al máximo el tiempo de respuesta de interrupción para ver si se logra contrarrestar el efecto del tiempo crítico de efectividad del pulso (t_c)

3.1.6 Forma de la celda:

La celda de tratamiento en forma generalizada consiste en dos superficies conductoras separadas en sus extremos por un material aislante de muy baja conductividad eléctrica, con lo cual queda un recipiente volumétrico para incorporar la muestra entre los electrodos. En la celda de tratamiento se busca en la generalidad una distribución homogénea de la carga eléctrica en la muestra para que sea un proceso fácil de modelar y predecir, lo que es de especial importancia si se trabaja con inactivación de microorganismos ya que una mala distribución de carga genera gradientes de bajo voltaje y puede comprometer toda la muestra. Por este motivo se prefiere trabajar con celdas de superficies paralelas equidistantes a lo largo de su superficie como también es deseable que posean la misma área de intercambio, ya que así se evitan saturaciones de conductividad en el electrodo de menor superficie (Kai y cols., 2011). Existen dos tipos generales de celda, las de tratamiento continuo y las de tratamiento en batch. A escala de laboratorio se prefiere utilizar celdas de tratamiento batch, ya que no requieren de equipos de bombeo lo que las hace de un menor tamaño y costo total, su restricción eso si se refleja en los volúmenes reducidos de muestra que son posibles de tratar. Existen muchas geometrías para los electrodos y celdas, pero predominan en la literatura las de electrodos de placas paralelas equidistantes (figura 3.8a) o las de configuración cilíndrica (figura 3.8b). Ambas tienen sus ventajas y desventajas en términos de distribución de carga, pero se centrará el estudio en un diseño de placas paralelas planas.

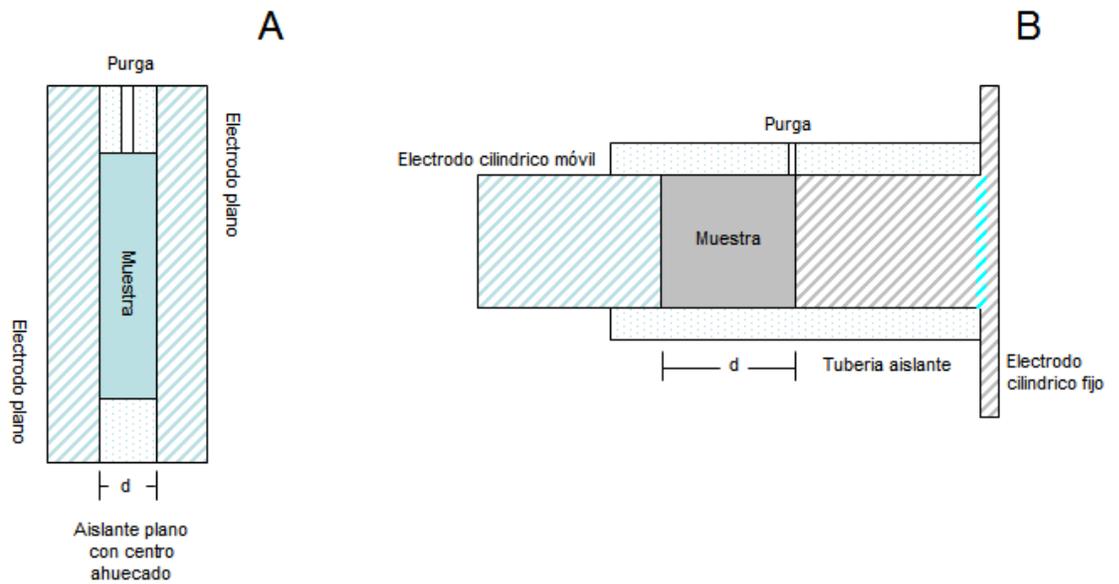


Figura 3.8: a) Celda de placas paralelas tipo sándwich, b) Celda de placas paralelas tipo embolo de distancia ajustable

Para sistemas continuos se utilizan también variaciones en la distancia de los electrodos lo que permite, acorde a la posición de la muestra en la celda, generar gradientes de potencial eléctrico en el tiempo, generando un esquema de pretratamiento, tratamiento y retención similar al de los tratamientos térmicos, pero su efectividad aun esta en estudio y se escapa de los objetivos de diseño de esta investigación. (Huang y Wang, 2009)

Aparte del diseño eléctrico de la celda, se debe considerar su aplicación en alimentos, por lo que la limpieza y posibilidad de esterilizar la celda para estudios con microorganismos debe incorporarse al diseño. Para este fin se utilizan electrodos metálicos inertes, pulidos y sin oclusiones y materiales aislantes que no se alteren química ni físicamente ante las altas temperaturas de esterilización. (Huang y Wang, 2009)

3.2 Resultados Diseño, Cálculo y Construcción Equipo de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad

3.2.1 Descripción general del equipo

El equipo consiste en una etapa inicial la cual regula el voltaje desde la alimentación de red de 220 VAC a un rango entre 0 y 250 VAC, este voltaje alimenta a un transformador generador de alto voltaje con un factor multiplicador de 1:68 volts dado por su configuración entre el embobinado primario y secundario. Posteriormente este alto voltaje de salida es rectificado mediante un puente rectificador de onda completa y suavizado en el banco de condensadores, obteniendo corriente continua de alto voltaje. La descarga de los condensadores es controlada por los dos interruptores de un polo y dos posiciones (SPDT) los cuales se encuentran conectados en configuración de puente H para descargar a la celda de tratamiento de forma controlada según los parámetros programados en un microcontrolador. Se puede ver el diagrama de bloques de las etapas generales en la figura 3.9

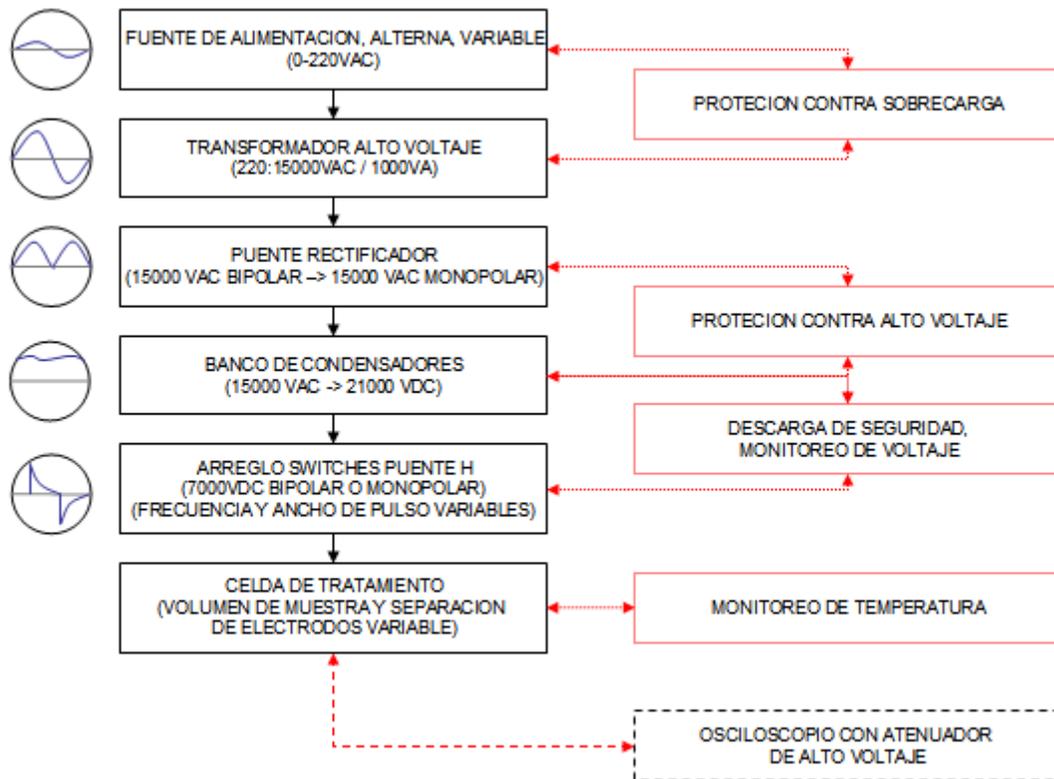


Figura 3.9: Diagrama de bloques para las distintas etapas en equipo HIPEF

3.2.2 Características del equipo:

Las características operacionales del equipo construido considerando los parámetros de diseño son:

- Voltaje de descarga: 0-15 kV (ajustable)
- Energía acumulada: 0,33 - 1,33 uF (ajustable en unidades de 0,33 uF)
- Polaridad de los pulsos: bipolar-monopolar (programable)
- Forma de los pulsos: exponencial
- Periodo entre pulsos: 0,1 - 60 s (programable)
- Simetría de los pulsos: 1 - 99% (programable)
- Volumen de celda: 50 ml (fijo)
- Separación entre electrodos: 1 cm (fijo)

También cuenta con sensores para el monitoreo de: Voltaje de alimentación, voltaje de carga y descarga en etapa de alto voltaje, temperatura inicial y final de muestra.

3.2.3 Mecanismos de seguridad:

Debido a que es un equipo que produce descargas de alto voltaje a corrientes elevadas, se toman las medidas de seguridad adecuadas descritas a continuación:

- Sistema de funcionamiento cerrado en caja aislada eléctricamente hasta 30 kV en todas sus partes.
- Descarga rápida de banco de condensadores y desconexión de transformadores en caso de apertura del equipo o término del tratamiento.
- Luz piloto de funcionamiento en etapas de alto y bajo voltaje.
- Botón de pánico para el apagado rápido del equipo.
- Limitador de corriente para carga de condensadores para proteger el transformador de sobrecarga.
- Atenuador para puntas de prueba en compartimiento de alto voltaje

- Sistema de control digital aislado mediante optoacopladores y protectores de transientes para sobrevoltaje en las líneas de transmisión.

3.2.4 Planos esquemáticos eléctricos

Se anexan los planos esquemáticos eléctricos del equipo. Se subdividen en planillas según las siguientes descripciones:

- Etapa generadora y de manejo en alto voltaje (Anexo 3.2.4.1).
- Conexión de circuitos para medición en alto voltaje (Anexo 3.2.4.2).
- Lógica de control en bajo voltaje (Anexo 3.2.4.3).
- Conexión de servomotores de control alto voltaje desde etapa lógica (Anexo 3.2.4.4).

3.2.5 Selección de componentes

3.2.5.1 Fuente de poder de alto voltaje:

Debe ser capaz de entregar 15 kV a una corriente mayor a la de descarga parasita del banco de condensadores y su divisor de voltaje, que se estiman cercanos a 5 mA.

Se utilizo un transformador de 15 kVAC / 30 mA / 450 VA modelo 92-6005-10 fabricado por la empresa Linsa S.A (ver figura 3.10).



Figura 3.10: Transformador de alto voltaje 15 kVAC / 30 mA / 450 VA

3.2.5.2 Regulador de voltaje alterno:

Para alimentar el transformador de alto voltaje se utilizó un variac de 1000VA con un rango de trabajo de 0-250 VAC modelo M10-520 fabricado por la empresa MCP (ver figura 3.11).



Figura 3.11: Variac 0-250VAC 1000VA

3.2.5.3 Etapa de protección y encendido:

3.2.5.3.1 Fusible de protección:

Para proteger el variac y el transformador de alto voltaje de sobrecarga se utilizó un fusible automático lento de 2,5 A / 220 VAC el cual se corta a potencias superiores a los 550 W lo cual se encuentra dentro de la tolerancia operacional del variac y el transformador de alto voltaje. Es fabricado por la empresa Lexic (ver figura 3.12).



Figura 3.12: Fusible automático lento 2,5A

3.2.5.3.2 Relé de encendido:

Para el relé de encendido se prefirió utilizar una combinación de 2 relés de un polo dos posiciones en paralelo a diferencia de uno solo de dos polos dos posiciones. Esto debido a que en caso de fallo de uno aun se efectúa el corte de la alimentación. Se utilizaron 2 relés de 10A / 220 VAC controlados a 12 VDC producidos por la empresa Metaltec, modelo AY1RC2 (ver figura 3.13).



Figura 3.13: Relés 10A / 220VAC y 12VDC

3.2.5.4 Etapa de rectificación:

Se opta por términos de eficiencia energética utilizar una etapa rectificadora de onda completa utilizando 4 diodos de alto voltaje en configuración de puente rectificador, modelo: 2CL2FM con tensiones de trabajo máximos de 20 kV y 100 mA de carga cada uno (ver figura 3.15).

3.2.5.5 Diodos de distribución:

Para distribuir la carga en dos bancos de condensadores independientes se utilizaron dos diodos en paralelo a la salida de la etapa rectificadora, modelo: 2CL2FM (ver figura 3.15) con tensiones de trabajo máximos de 20 kV y 100 mA de carga cada uno. Esto permite cargar de forma independiente los bancos de condensadores y trabajar de forma efectiva con ráfagas de descarga bipolares (simetría del periodo bipolar menor al 1%).

3.2.5.6 Etapa acumuladora de carga:

3.2.5.6.1 Banco de condensadores:

Se opta utilizar valores de capacitancia mencionados en la literatura (DeVito, 2006), con una selección de capacitancias entre los valores de 0,33 a 1,33 uF.

Debido a la poca variedad y el precio prohibitivo de los condensadores de alta tensión para valores cercanos a 1 uF y tensiones de trabajo sobre 15 kV, se escogió utilizar condensadores de mayor disponibilidad en el mercado. Para esto se utilizaron cuatro 'clusters' de 3 condensadores de 1 uF conectados en serie.

Cada uno de estos condensadores posee una tensión máxima de trabajo de 8000 VDC lo cual aumenta su tensión máxima operacional al conectarlos en serie de la forma:

$$V_t = V_1 + V_2 + V_3$$
$$V_t = 8000V + 8000V + 8000V = 24000 \text{ VDC}_{\text{max}}$$

Este valor supera el máximo voltaje entregado por el transformador, definido como:

$$V_{\text{peak}} = V_{\text{rms}} * \sqrt{2} \quad \text{Ec. 3.6}$$
$$V_{\text{peak}} = 15000 * \sqrt{2} = 21213 \text{ V}$$

Un problema que surge al conectar condensadores en serie, es que disminuye su capacitancia por lo que para el caso anterior resultan:

$$1/C_t = (1/C_1) + (1/C_2) + (1/C_3) \quad \text{Ec. 3.7}$$
$$1/C_t = (1/1\mu\text{F}) + (1/1\mu\text{F}) + (1/1\mu\text{F}) = 0,33 \mu\text{F} \text{ por 'cluster'}$$

Otro problema de aplicar esta estrategia, en especial para aplicaciones en alto voltaje es que los condensadores poseen una tolerancia del 10% en su valor de capacitancia nominal, lo que altera la distribución de voltaje entre ellos al momento de cargarlos generando potenciales fallos por sobrevoltaje.

Para evitar esto se incorpora un divisor de voltaje resistivo de alta impedancia paralelo a la cadena de condensadores como se muestra en el

esquemático general del equipo, lo que cumple el propósito de ecualizar el voltaje entre los condensadores y a su vez descargan lentamente los condensadores, evitando que queden con alguna carga residual posterior al apagado del equipo.

El valor de las resistencias para un consumo mínimo del divisor se calcula mediante la ecuación:

$$R = (n * V_m - V_b) / (0,0015 * C * V_b)$$

Ec. 3.8 (CDM Cornell Dublier, 2011)

Con:

R = Resistencia por condensador [MΩ]

V_m = voltaje máximo tolerado por condensador [V]

V_b = voltaje máximo de operación del banco [V]

n = número de condensadores conectados en serie

C = capacitancia por condensador [uF]

Para el caso del equipo:

$$R = (3 * 8000 - 15000) / (0,0015 * 1 * 15000) = 1000 \text{ M}\Omega$$

Se utilizó un valor de 10 MΩ / 1 W para cada resistencia del circuito, lo cual es un valor inferior al calculado pero vienen incorporadas en el tambor de cada condensador entregando un buen coeficiente de disipación térmica.

Los condensadores propiamente tal son de la empresa *Samwha capacitor company* con una capacidad nominal de 1 uF y voltajes de operación hasta 8kV. (ver figura 3.14)



Figura 3.14: Etapa acumuladora dividida en dos bancos de condensadores de 0,66 uF para descarga bipolar en ráfaga.

3.2.5.6.2 Resistencia limitadora de carga:

Para evitar la sobrecarga del transformador se requiere de una resistencia limitadora de carga calculada mediante la ecuación:

$$I = (V_s - V_c) / R$$

Ec. 3.9

con:

I: corriente de carga de condensadores [A]

V_s : Voltaje entregado por la fuente de alimentación [V]

V_c : Voltaje de carga del condensador (depende del tiempo de carga) [V]

R: Resistencia limitadora [Ω]

Como en un comienzo $V_c = 0V$ la corriente inicial y 'peak' de descarga se puede definir como:

$$I_0 = V_{\text{peak}} / R$$

Lo que para el equipo funcionando al máximo de su capacidad (30 mA y 21213 V_{peak}) resulta:

$$0,02 = 21213 / R$$

$$R = 1060650 \Omega \approx 1 \text{ M}\Omega$$

Se debe considerar que no se trabaja todo el tiempo a condiciones de máximo trabajo y que el transformador de por si tolera un poco más de su capacidad nominal por lo que se puede considerar un 20% del valor calculado para fines de protección por sobrecarga en transformadores (4hv.org, 2011), entregando una resistencia de 200 k Ω .

Esta resistencia se creo a partir de 200 resistencias de 1 K Ω , ½ W y 300 V conectadas en serie y aisladas mediante el recubrimiento con una tubería de silicona para evitar arcos eléctricos entre los componentes. Obteniendo una resistencia de 200 k Ω , 100 W y 60 kV nominales.

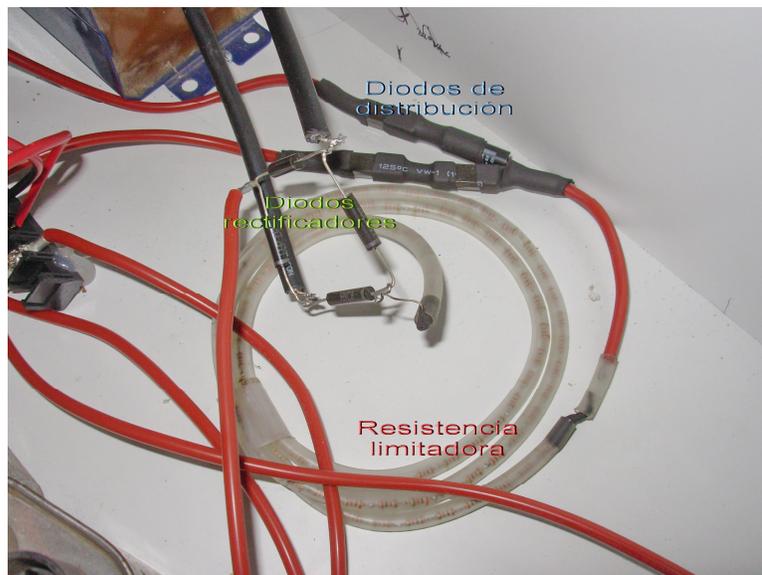


Figura 3.15: Diodos rectificadores 20 kV / 100 mA, diodos de distribución 20 kV / 100 mA y resistencia limitadora de carga

3.2.5.7 Resistencia para celda de prueba:

Para medir los parámetros operacionales y corroborar el funcionamiento adecuado del equipo se requiere de una celda de prueba, la que consiste en una resistencia de valor conocido capaz de soportar la energía de descarga del equipo.

Para este fin se utilizó una resistencia electrolítica acuosa, ya que soportan muy bien los altos voltajes y son de fácil manipulación para ajustar su

valor de resistencia (Beverly y cols., 2008). Sus desventajas son que la resistividad de la solución electrolítica depende de la temperatura cambiando acorde a la energía disipada en el tiempo y su valor de resistencia cambia a tiempos prolongados por la generación de cristales en los electrodos y la evaporación del solvente (Beverly y cols., 2008).

Para su fabricación se utilizó un diseño de celda tubular de 5mm de diámetro interno con electrodos de bronce y una solución de sulfato de cobre 2M en agua. Ajustando el largo de la tubería, uno puede variar la resistividad de la celda entre los valores de interés, en este caso 10 K Ω a 100 K Ω medidos a través de un multímetro digital a temperatura ambiente.

Para calcular el largo de la tubería según su resistividad se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$R = \rho l / A$$

Ec. 3.10 (Beverly y cols., 2008)

con:

R: Resistencia de la celda [Ω]

l: la distancia entre los electrodos paralelos [cm]

A: área de los electrodos [cm²]

ρ : resistividad de la solución [$\Omega \cdot \text{cm}$]*

(*a temperatura y concentración constantes)

ρ depende implícitamente de la temperatura y explícitamente de la concentración. Si se considera una temperatura constante entonces:

$$\rho = a \cdot C^b$$

Ec. 3.11 (Beverly y cols., 2008)

con:

C: concentración de la solución [g/l ó M]

a y b: constantes experimentales de la celda

a y b pueden obtenerse por regresión desde la gráfica de resistividad vs. concentración para la celda de la forma mostrada en la figura 3.16:

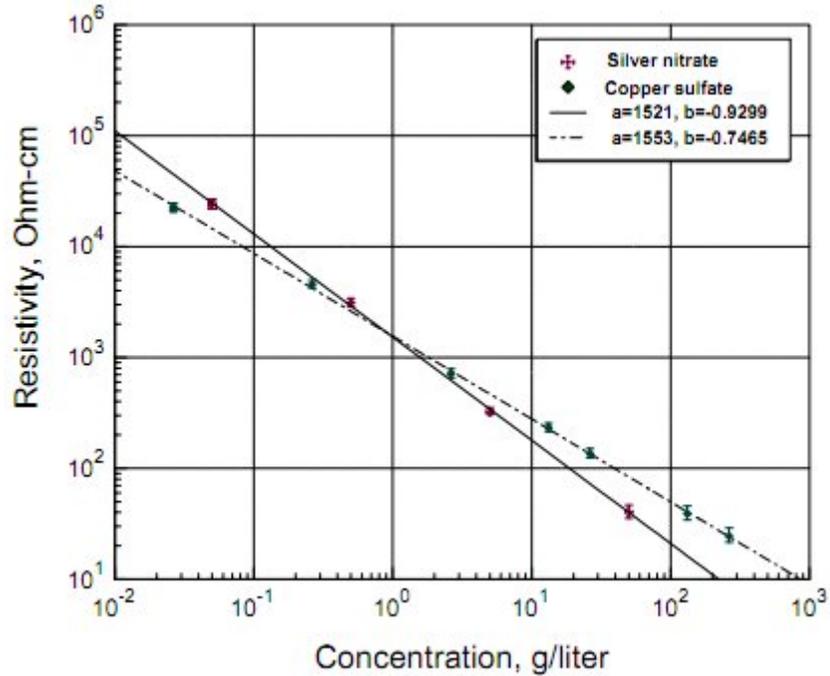


Figura 3.16: Ejemplo de gráfico de resistividad vs. concentración para una celda electrolítica cilíndrica con electrodos paralelos de 5 cm² de superficie para soluciones de sulfato de cobre y nitrato de plata. (Beverly y cols., 2008).

Los largos reales de celda se estimaron mediante calculo y luego se ajustaron de forma experimental al 10% de su valor nominal utilizando como electrolito una solución de sulfato de cobre 2 M en la celda tubular antes descrita y electrodos de bronce en los terminales .

Se obtuvieron resistividades de 10 kΩ, 50 kΩ y 100 kΩ con largos de celda de 64,5 cm, 101,2 cm y 150,0 cm, se puede ver la medición de una celda electrolítica en la figura 3.17.



Figura 3.17: Resistencia electrolítica tubular con solución de 2 M de sulfato de cobre y una resistividad de 10 K Ω aprox.

3.2.5.8 Interruptores de descarga para celda:

Debido a que no existe en el mercado un interruptor de las características requeridas, se construyó acorde a las especificaciones requeridas.

Se utilizó como principio de funcionamiento interruptores de descarga por arco de plasma describiendo su comportamiento por la ecuación de Paschen (1889) (Ec. 3.5), pero se incorporaron también características propias de un interruptor electromecánico para obtener control en el periodo entre descargas y la opción de tener dos electrodos de salida para generar un interruptor de un polo, dos posiciones.

Los interruptores físicamente se componen de dos electrodos fijos y un electrodo móvil el cual es controlado por un servomotor. Al desplazar el electrodo móvil sobre el electrodo fijo existe una separación menor a la de ruptura dieléctrica del aire medioambiental, con lo cual se forma un arco de plasma y se transfiere efectivamente la carga. Esto evita la fusión entre los electrodos, producida por el contacto directo y las altas temperaturas del plasma.

Mediante el desplazamiento del electrodo móvil se puede alternar la descarga entre los terminales de salida así como también controlar el tiempo entre descargas dependiendo de la posición del electrodo dada por un brazo con movimiento rotatorio (ver figura 3.18).

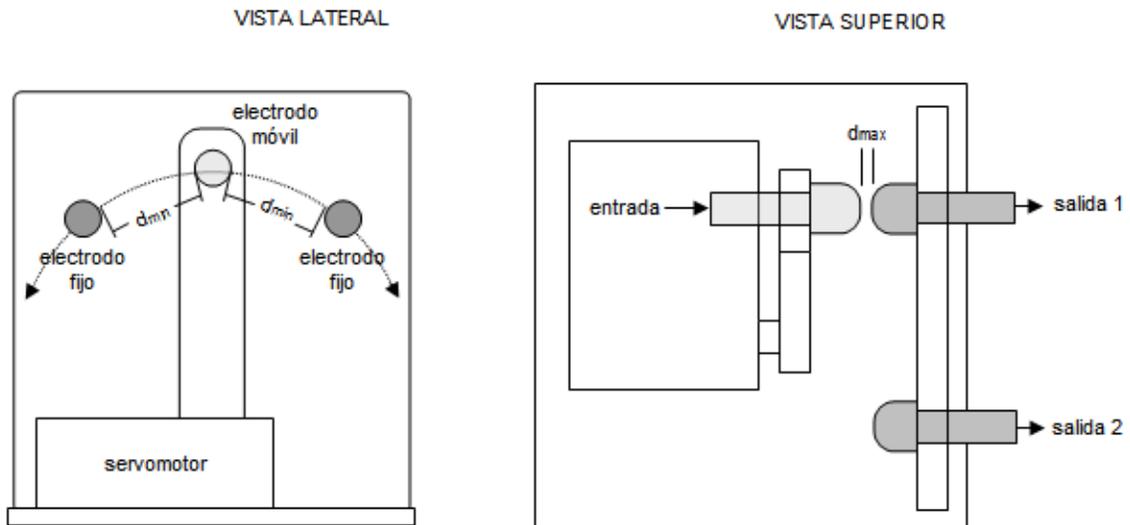


Figura 3.18: Diagrama de interruptor de descarga: vista lateral (apagado), vista superior (activado)

Para calcular la separación entre el electrodo móvil y fijos (d_{max}) se utilizó la ecuación de Paschen (1889) (Ec. 3.5), considerando al aire medioambiental como gas de transferencia, un voltaje para la descarga mínimo de 1 kV y 1 atm de presión:

$$1000 = \frac{43,6 \times 10^6 (1 * d_{max})}{\ln(1 * d_{max}) + 12,80}$$

*Los coeficientes a y b se consideran a presión de 1 atm y un HR del 50% ver nota en Ec. 3.5

$$d_{max} = 7,6 \times 10^{-5} [m] \approx \mathbf{0,1 [mm]}$$

Para evitar la descarga accidental de los electrodos al apagar el interruptor, se requiere que el electrodo móvil tenga una posición central neutra equidistante entre los electrodos fijos que sea mayor a la distancia requerida para la ruptura dieléctrica del aire al voltaje máximo de operación del equipo de

21213 V Incorporando como factor de seguridad un 100% más del valor resultante, resulta en:

$$21213 = \frac{43,6 \times 10^6 (1 * d_{\min}')}{\ln(1 * d_{\min}') + 12,80}$$

$$d_{\min}' = 3,47 \times 10^{-3} \text{ [m]} \approx 3,47 \text{ [mm]}$$

$$d_{\min} = d_{\min}' * 2,00 = \mathbf{6,94 \text{ [mm]}}$$



Figuras 3.19: Interruptores de descarga: vista lateral (apagado), vista superior (apagado)

El servomotor se alimenta mediante el circuito de control a una tensión lógica de 5VDC y se controla mediante modulación de ancho de pulsos generados por el microcontrolador. La señal y la alimentación se protegieron contra sobrevoltaje y ruidos de alta frecuencia inducidos por la descarga de los arcos de plasma utilizando diodos de protección (clipper) y filtros pasivos de paso de baja frecuencia ($f_{\text{corte}} = 100 \text{ hz}$). Se agrega una imagen de los interruptores terminados en la figura 3.19.

3.2.5.9 Switch de descarga rápida:

Se diseñó un interruptor para la descarga rápida en dos etapas basado en mismo diseño de los interruptores de descarga de celda pero con un solo electrodo fijo. Como se requiere descargar toda la energía acumulada en el banco de condensadores mediante el arco de plasma generado al cierre del interruptor, se diseñó un interruptor con electrodos reemplazables para mantenerlos vigentes tras su uso.

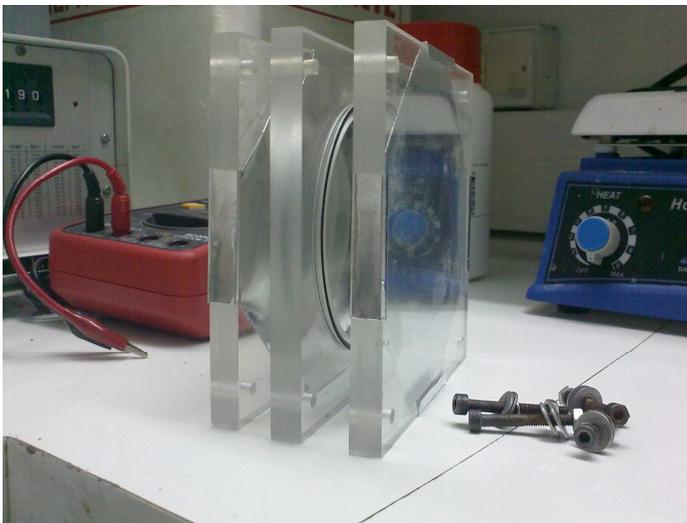
Debido a que el arco de plasma deja de ser efectivo para valores inferiores a 1 kV, se incorporó una segunda etapa de descarga por contacto directo. Para ello se incorporó una “pestaña” al electrodo fijo formada por una lamina de cobre de 0,1 mm de espesor que entra en contacto con el electrodo móvil al continuar su desplazamiento y produce un cortocircuito efectivo por contacto, disipando la energía restante en la lamina la cual también se deteriora y debe ser reemplazada en el tiempo (ver figura 3.20).



Figuras 3.20: Interruptor de descarga rápida: vista lateral (en posición de corte de seguridad), vista superior (en posición de corte de seguridad)

3.2.5.10 Celda de tratamiento:

Se fabricó una celda de placas paralelas consistente en tres placas cuadradas acrílicas de 10 mm de espesor cortadas a 120 x 120 mm y unidas por 4 pernos de fijación de 4 mm de diámetro en sus esquinas. La placa central se le incorporo una cavidad cilíndrica de 80 mm de diámetro sellado mediante orings de 82mm de diámetro y un orificio superior de purga. Ambos electrodos se fabricaron a partir de láminas de aluminio de 0,1 mm de espesor plegadas sobre la cara interna de las placas acrílicas exteriores. Esto permite el fácil reemplazo de los electrodos en caso de deterioro y en conjunto una celda de fácil limpieza y la posibilidad de esterilización en autoclave si se trabaja con muestras microbiológicas. Se adjuntan imágenes de la celda separada en sus componentes en la figura 3.21



Figuras 3.21: Celda de tratamiento: vista lateral y vista interna

Los planos detallados de la celda se encuentran en el anexo 3.2.5.10



3.2.5.11 Etapa de monitoreo de proceso:

3.2.5.11.1 Atenuadores de voltaje:

Para la medición en las etapas de alto voltaje, se utilizaron dos divisores de voltaje resistivos (ver figura 3.22) con un factor de división de 1:100 con una impedancia total de 10 MΩ calculado como:

$$V_s = \frac{R_2}{R_1 + R_2} * V_e$$

Ec. 3.12

Reemplazando para una resistencia total de 100 MΩ y una división de 1:100:

$$10 \times 10^6 = R_1 + R_2$$

$$1 = \frac{R_2}{10 \times 10^6} * 100$$

Con lo que resulta:

$$R_1 = 9,9 \text{ M}\Omega \text{ y } R_2 = 0,1 \text{ M}\Omega$$

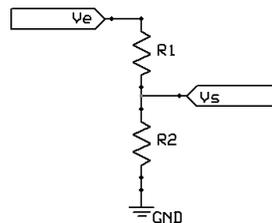


Figura 3.22: Esquemático divisor de voltaje resistivo

R1 se creó a partir de 9 resistencias de 1 MΩ y 1 resistencia de 100 KΩ
El diagrama del circuito se detalla en el esquemático general del equipo.

3.2.5.11.2 Voltímetros:

Para las mediciones de voltaje en la etapa de alto voltaje, en conjunto con un atenuador resistivo, se ocupó un multímetro digital marca UNI-T modelo UT60-A con un rango de medición de 0-1000 VDC y una precisión de ± 1 VDC.

Para las mediciones en el voltaje de alimentación del transformador de alta, se utilizó un voltímetro de aguja análogo incorporado en el variac, con un rango de medición de 0 a 300 VAC y una precisión de ± 10 VAC

3.2.5.11.3 Osciloscopio:

Para monitorear la forma de los pulsos y el voltaje aplicado a la muestra en el tiempo, se utilizó en conjunto a un atenuador resistivo un osciloscopio de captura digital marca UNI-T modelo UT81B que posee una resolución de captura máxima de 8 msp/s y un rango operacional de voltaje de 0-1000 VDC con una precisión de ± 1 V para esa escala de voltaje.

3.2.5.11.4 Termómetro:

Para medir la temperatura de la muestra se utilizó un termómetro infrarrojo fabricado por Asun Test Ltd., modelo DT8260 con un rango de medición de -20 a 260 °C y una precisión del 5% del valor nominal en ese rango.

3.3 Caracterización del Equipo de Pulsos Eléctricos

Para corroborar el correcto funcionamiento del equipo y caracterizar sus parámetros operacionales se analizó el comportamiento de carga y descarga del banco de condensadores hacia la celda de tratamiento a resistividades conocidas. Ambos en función del voltaje en el tiempo.

3.3.1 Carga banco de condensadores:

Al observar mediante el osciloscopio el voltaje de carga del banco de condensadores se obtuvo una curva característica para la carga de condensadores en un circuito R-C con una retención del voltaje de carga en el tiempo como lo muestra la figura 3.23. Lo cual demuestra que el equipo es capaz de cargar y rectificar a su máximo voltaje operacional el banco completo de condensadores.

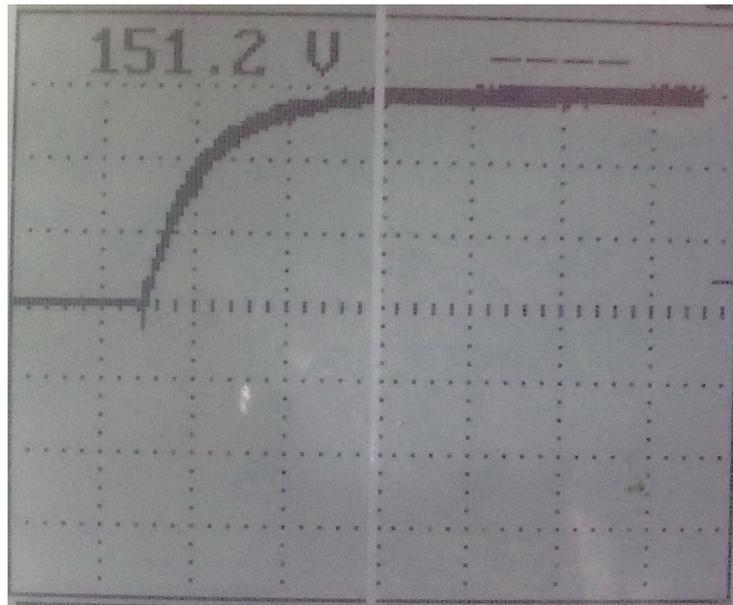


Figura 3.23: Carga banco de condensadores a 1,33 μF y 15 kV (V:5000 V/div t:1 s/div)

Para asegurar la completa carga del banco de condensadores entre cada pulso se diseñó un experimento mediante superficie de respuesta de 12 puntos y 1 repetición para medir los tiempos mínimos de carga (T_{min}) requeridos por el equipo para distintas configuraciones de capacitancia y voltaje en el banco de condensadores.

Se obtuvo como resultado la superficie de respuesta mostrada en el gráfico 3.1 a voltajes de 5, 10 y 15 kV y capacitancias de 0,33, 0,66, 1,00 y 1,33 uF

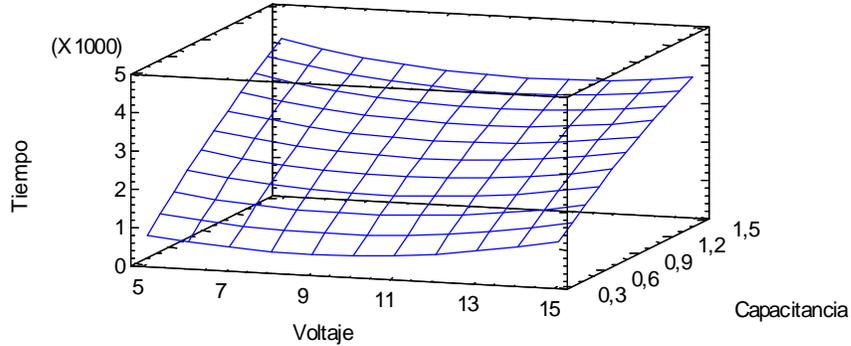


Gráfico 3.1: Superficie de respuesta para tiempo de carga total vs capacitancia y voltaje

Ecuación ajustada para tiempo mínimo de carga:

$$T_{\min} = 692,245 - 289,766V + 4100,08C + 17,5V^2 - 69,559VC - 507,413C^2$$

Ec. 3.13

Siendo:

T_{\min} : Tiempo mínimo para carga de condensadores (ms)

V: voltaje máximo de carga (kV)

C: Capacitancia de condensadores (uF)

Con un estadístico R^2 estandarizado del 80,2% de representatividad para los dos factores, lo cual pese a no ser muy representativo permite aproximar los valores de trabajo experimental teniendo que incorporar un margen de seguridad de al menos 20% sobre el valor mínimo calculado de T_{\min} .

Sobre la significancia de los parámetros de capacitancia y voltaje sobre T_{\min} se obtuvo un efecto significativo solo por parte de la capacitancia con un 95% de confianza como se muestra en el gráfico 3.2.

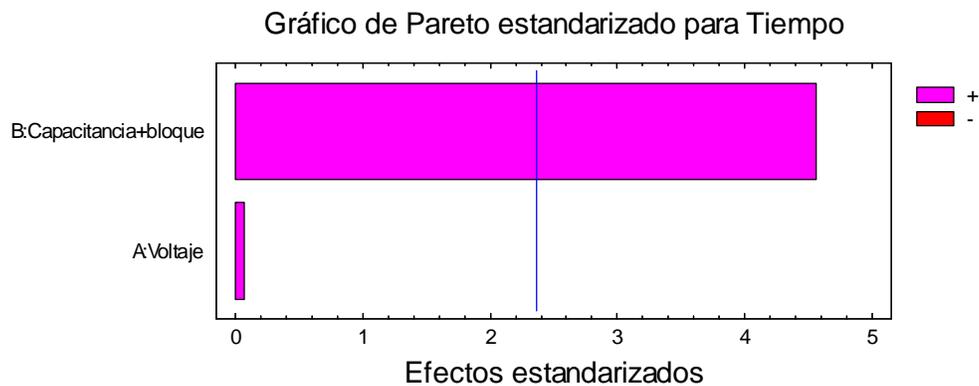


Gráfico 3.2: Pareto estandarizado al 95% de confianza para efectos de la capacitancia y voltaje en el tiempo de carga

3.3.2 Descarga en celda electrolítica:

Al observar mediante el osciloscopio el voltaje de descarga a la celda electrolítica se logro corroborar el correcto funcionamiento de los interruptores al máximo voltaje operacional y menor resistividad de celda. Entregando pulsos característicos de decaimiento exponencial en el tiempo como se muestra en la figura 3.24:

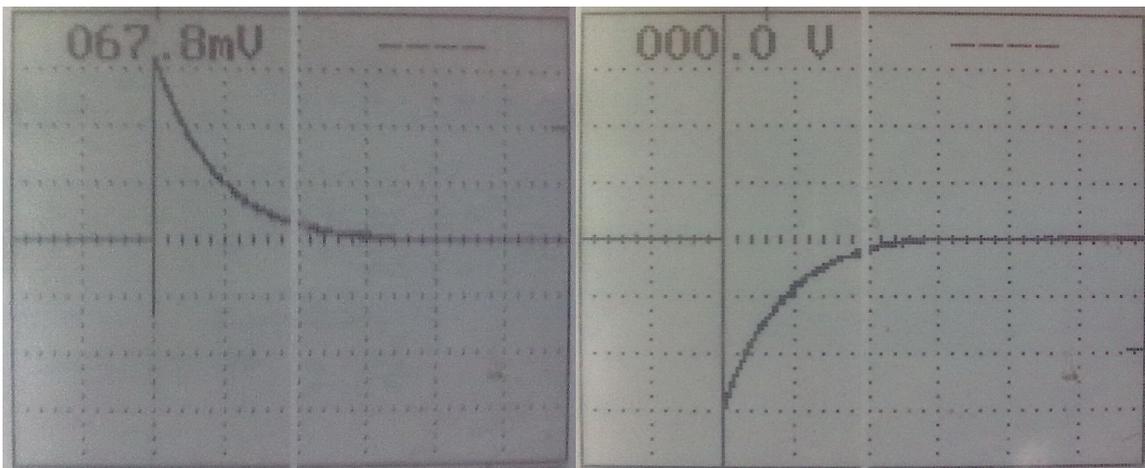


Figura 3.24: Descarga a 0,66 uF bipolar, 15 kV y 10 kΩ (V:5000 V/div t:10 ms/div)

Para caracterizar la duración de los pulsos de descarga en la celda de tratamiento se diseñó un experimento mediante superficie de respuesta con 9 puntos y 2 repeticiones para un valor fijo de capacitancia de 0,66 uF en modo bipolar, valores de resistividad en celda de 10 KΩ, 55 KΩ y 100 KΩ y voltajes de

5 kV, 10 kV y 15 kV con periodos fijos entre descargas de 2500 ms bipolares de lo que se obtuvo la gráfica 3.3:

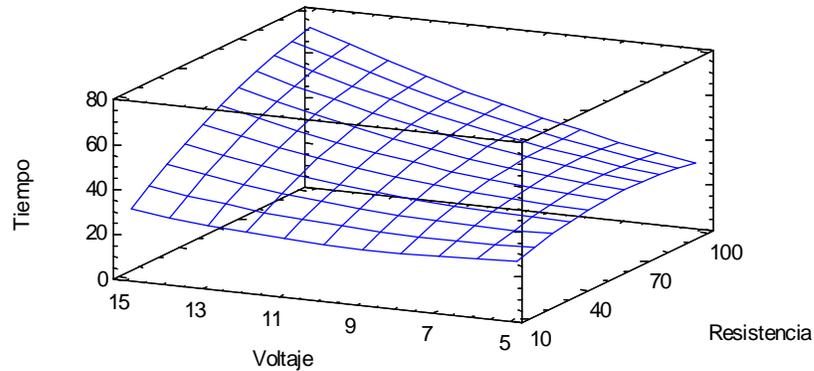


Gráfico 3.3: Superficie de respuesta para tiempo de descarga vs resistencia y voltaje

Ecuación ajustada para duración del pulso:

$$t_s = 34,2654 - 3,27778V + 0,150617R + 0,17V^2 + 0,0411111VR - 0,00271605R^2$$

Ec. 3.14

Siendo:

t_s : tiempo de duración del pulso (ms)

V: voltaje máximo de descarga (kV)

R: Resistividad de la celda ($k\Omega$)

Con un estadístico R^2 estandarizado del 97,9% de representatividad para los dos factores.

Sobre la significancia de los parámetros de resistencia y voltaje sobre la duración del pulso de descarga se obtuvieron efectos significativos tanto para el voltaje como para la resistencia con un 95% de confianza, como lo muestra el gráfico 3.4.

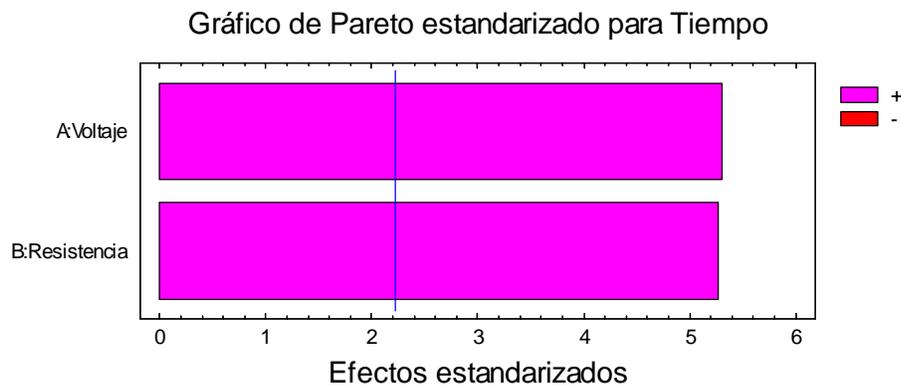


Gráfico 3.4: Pareto estandarizado al 95% de confianza para efecto de la capacitancia y voltaje en el tiempo de carga

Mediante las ecuaciones 3.13 y 3.14 se pueden estimar los parámetros operacionales del equipo según la resistividad de celda, capacitancia y voltaje requeridos mediante la ecuación:

$$T_{\min} = (T - t_s) * (\%_s / 100)$$

Ec. 3.15

Siendo:

T_{\min} : Tiempo mínimo para carga de condensadores (ms)

T: Periodo entre pulsos (ms)

t_s : Duración del pulso (ms)

$\%_s$: porcentaje de simetría en periodo

*estas variables se pueden ver representadas de forma gráfica en la figura 3.5

Para utilizar pulsos bipolares se requiere cargar dos bancos de la misma capacitancia por lo que se debe calcular el tiempo según el doble del valor de capacitancia requerido (ej: 0,66 uF bipolar = 1,33 uF monopolar).

Las tablas de datos para los tiempos de duración de los pulsos y ejemplos de los datos obtenidos en el osciloscopio se encuentran en el anexo 2.

3.3.3 Observaciones en funcionamiento del equipo

Carga de condensadores:

- Existe una pérdida de eficiencia en la conversión de voltaje por parte del transformador de alto voltaje al alimentarlo a un voltaje inferior al cual fue diseñado (220 VAC), llegando a requerir un incremento del voltaje de alimentación que varía hasta en un 200% del teórico cuando se trabaja a voltajes de salida del orden de 5 kV. Pese a todo este es un efecto esperado y conocido en los transformadores y por lo mismo se regula el alto voltaje hasta su valor nominal mediante instrumentación independiente del voltaje de alimentación que requiera para obtenerlo.

- Al mantener el voltaje de alimentación constante y minimizar la capacitancia aumenta el voltaje de carga en un $3\pm 1\%$ cada 0,33 uF removidos, esto se debe a que se reduce el consumo de corriente de pérdida dado por las resistencias en paralelo a los condensadores, disminuyendo el porcentaje de ruido en la rectificación y otorgando un voltaje más elevado. Este es un efecto a tomar en cuenta al momento de cambiar el valor de capacitancia en el banco.

Descarga hacia celda:

Cabe mencionar que se analizaron solo los tiempos de descarga para 0,66uF por lo que se puede estimar el tiempo de carga mínimo pero no la duración de los pulsos para otros valores de capacitancia, no se realizó una superficie de respuesta incorporando la capacitancia como una variable independiente ya que requiere de 72 experimentos y se escapa del objetivo y tiempos de ejecución de este proyecto.

- Existe ruido eléctrico asociado a la conexión y desconexión del interruptor por arco de plasma (ver figura 3.25) el cual aumenta acorde aumenta la resistividad en los terminales del interruptor, ya sea por el deterioro de los electrodos o una resistividad muy elevada en la celda de tratamiento (>50 k Ω). Para evitar este

efecto se deben reemplazar y ajustar la distancia de los electrodos de forma periódica e intentar trabajar con resistividades de celda menores a 50 K Ω .

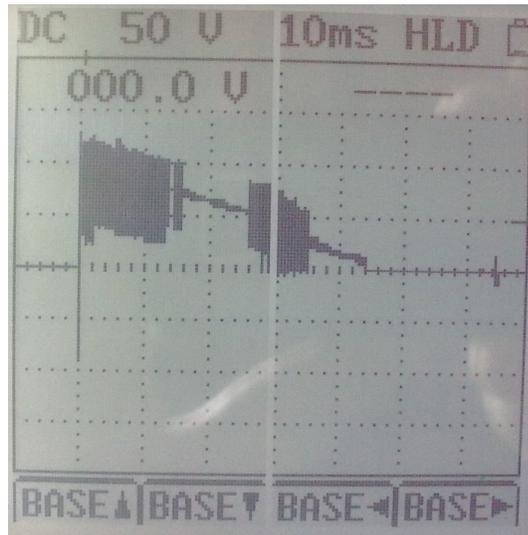


Figura 3.25: Pulso de descarga a 0,66 μ F, 10 kV y 50 K Ω con electrodos deteriorados
(V:5000 V/div t:10 ms/div)

- En los pulsos de descarga, existe un corte en el rango de los 1000-500 V (ver figura 3.26), lo cual afirma que la ecuación de Paschen (1889) (Ec. 3.5) es una buena aproximación para predecir los potenciales de ionización del aire y las distancias calculadas en interruptores son adecuadas para el correcto funcionamiento del equipo.

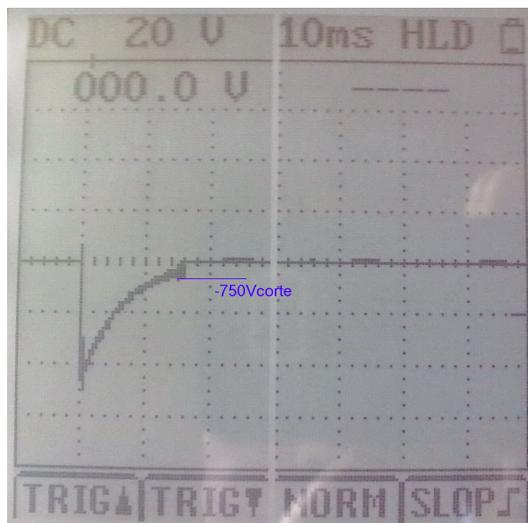


Figura 3.26: Pulso de descarga negativo a 0,66 μ F, 5 kV y 10 K Ω con corte a los -750 V
(V:2000 V/div t:10 ms/div)

3.3.4 Descripción gráfica del equipo de pulsos eléctricos

El equipo se subdivide en tres zonas:

- Zona de tratamiento de muestra
- Zona de manejo alto voltaje
- Zona de manejo voltaje de alimentación e instrumentación

Estas zonas se separan para evitar los riesgos asociados al posible contacto de soluciones salinas o muestra fluida con las etapas de alto (15 kVAC/15 kVDC) y medio voltaje (220 VAC) y para aislar eléctricamente en caso de descarga de plasma la etapa de alto voltaje de los circuitos de control y tratamiento de muestra lo que puede producir accidentes y daño tanto al operador como a los componentes del equipo.

En la figura 3.23 se señalan tanto las zonas de trabajo, como los componentes principales del equipo de pulsos eléctricos.

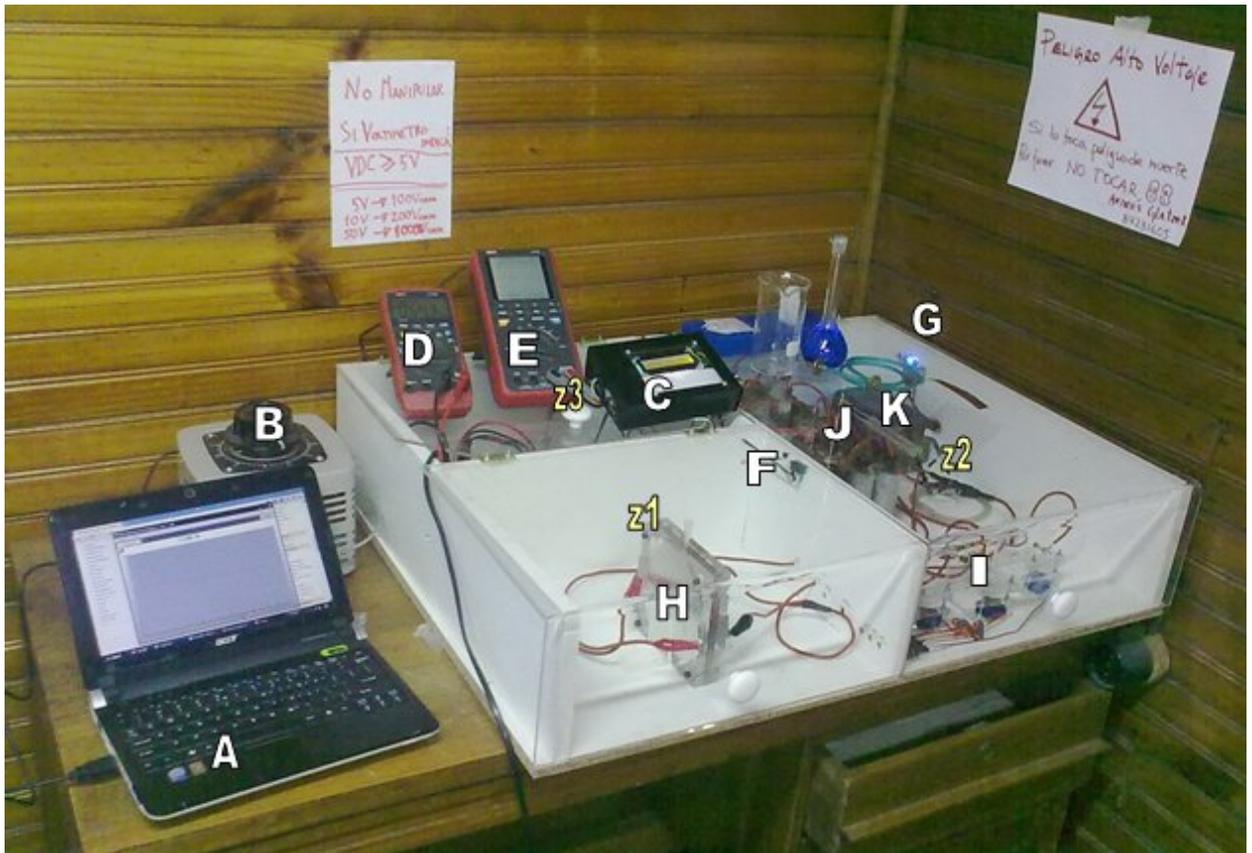


Figura 3.23: Equipo de pulsos eléctricos en funcionamiento.

Items:

Control y medición:

- A - Terminal de adquisición desde osciloscopio y de configuración de equipo
- B - Variac regulador de voltaje de alimentación para etapa alto voltaje
- C - Unidad de control para interruptores de alto voltaje, relés de alimentación y mecanismos de seguridad
- D - Voltímetro alto voltaje de medición instantánea para banco de condensadores
- E - Osciloscopio adquirente para celda de tratamiento

Mecanismos de seguridad:

- F - Interruptor de seguridad apertura tapa
- G - Luz piloto indicadora de alimentación zona alto voltaje

Componentes alto voltaje:

- H - Celda de tratamiento
- I - Interruptores de descarga a celda y descarga rápida de banco de condensadores
- J - Banco de condensadores
- K - Transformador de alto voltaje y etapa de rectificación

Zonas:

- Z1 - Zona de tratamiento muestra
- Z2 - Zona de generación y manejo alto voltaje
- Z3 - Zona de manejo voltaje de alimentación e instrumentación

4. METODOLOGIA DE TRATAMIENTO POR PULSOS ELECTRICOS DE PULPA DE TOMATE

4.1 Metodología de obtención de pulpa de tomate fresca

Se utilizó tomate fresco (*Lycopersicon esculentum*) de la variedad 'limachino' incorporando el fruto completo en un procesador de alimentos modelo "National Easy Cook" por 30 s a una velocidad de rotación de cuchilla fija de 1.500 rpm y a 20 °C.

La pulpa se tamizó con un tamiz de 1,5 mm. Se dejó reposar la muestra por 1 h privado de luz hasta lograr una separación de fases entre la espuma y la suspensión acuosa, eliminando la espuma sobrenadante. Se adjunta un diagrama de bloques con la metodología en la figura 4.1.

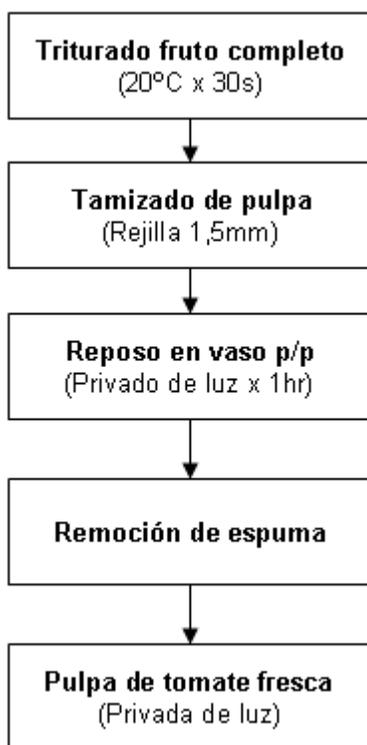


Figura 4.1: Diagrama de bloques para obtención de pulpa fresca de tomate

Se trabajó mediante batch diarios de pulpa fresca y análisis continuo de las muestras para evitar variabilidad en la composición al momento de comparar muestras.

4.2 Metodología de tratamiento por pulsos eléctricos para microscopía

Se retiraron 100 ml de pulpa acuosa para cada tratamiento y se apartaron 100ml de contramuestra sin tratar, se cargo la celda de tratamiento en cada caso y se midió su resistividad lo cual arrojó un valor promedio de $15 \pm 2 \text{ K}\Omega$ ($n=12$) con lo cual se corrobora que la muestra se ajusta a los parámetros operacionales del equipo. Se les aplicó un número incremental de pulsos eléctricos a cada una de las muestras con valores nominales de 200, 400, 800 y 1600 pulsos, manteniendo fijos los parámetros de voltaje de descarga (5 kV), capacitancia (0,66 uF), forma del pulso (bipolar) periodo de descarga (5 s) y simetría entre pulsos (50%). Esto con el fin de observar los cambios a nivel celular producidos por el número de pulsos aplicados, dejando constantes todos los otros parámetros operacionales (ver diagrama en figura 4.2).

El criterio para la selección del voltaje y capacitancia aplicados se derivaron de la ecuación de potencial de transmembrana crítico (ver sección 3.1.1) suponiendo un tamaño celular de 50um y células esféricas con lo cual se obtiene:

$$E_c = 1[V] / (1,5 * 2,5 \times 10^{-3}[\text{cm}])$$

$$E_c = 266 [V/\text{cm}]$$

Se utilizó también los datos experimentales de las experiencias realizadas en tejidos vegetales similares en las investigaciones de Eshtiaghi y cols. (2002) en remolacha, Gachovska y cols. (2006) en alfalfa y Lopes y cols. (2009) en betarraga, estimando un porcentaje sobre el potencial crítico de transmembrana para obtener una ruptura de membrana irreversible y un buen rendimiento de extracción de material intracelular, lo cual pese a no estar estandarizado en un monto para las diferentes experiencias, se encuentra en un rango aproximado de entre 1000 y 2000% sobre el valor de voltaje crítico, y con una capacitancia del orden de 0,5 a 1,0 uF por lo que se escogió trabajar al máximo valor de capacitancia del equipo en modo bipolar (0,66 uF) y un voltaje operacional de 5kV.

El resto de los parámetros se calcularon a partir de las fórmulas de tiempo de carga mínima del banco de condensadores (ver sección 3.3.1)

Al finalizar todos los tratamientos las muestras fueron comparadas mediante microscopía óptica en un microscopio Carl Zeiss Axiostar Plus, USA con aumentos de x5, x10, x40 y x100 para observar diferencias estructurales a nivel celular. Se adjunta un diagrama de bloques con la metodología en la figura 4.2.

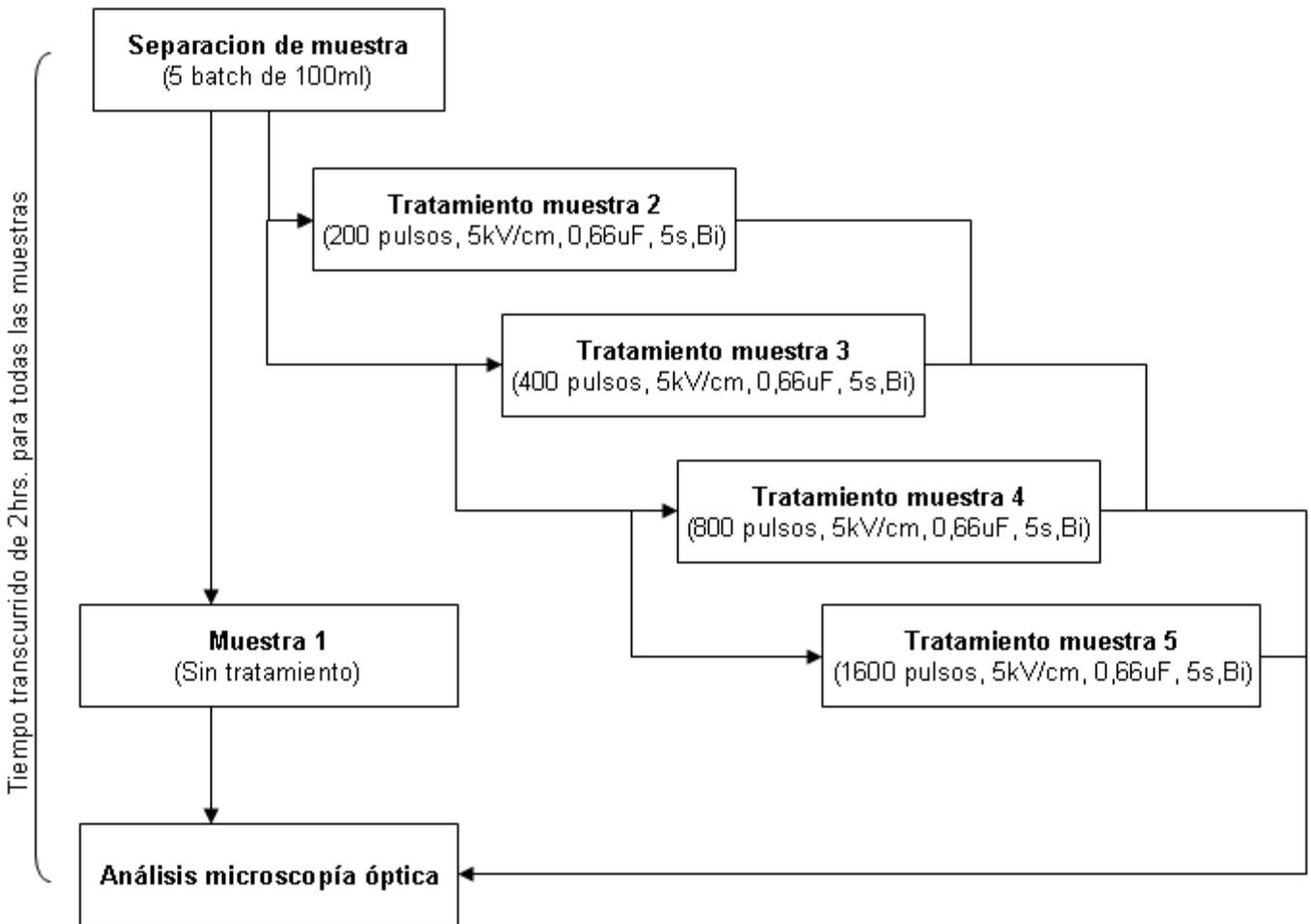


Figura 4.2: Diagrama de bloques para tratamiento de muestras para microscopía óptica.

4.3 Metodología para tratamiento por pulsos eléctricos para absorbancia de la pulpa de tomate.

Para cada uno de los tres tratamientos se usó 100 ml de pulpa acuosa, por duplicado. Se cargó la celda de tratamiento en cada caso y se midió su resistividad de lo cual se obtuvo un valor promedio de $16 \pm 3 \text{ K}\Omega$ ($n=9$) con lo cual se corrobora que la muestra se ajusta a los parámetros operacionales del equipo.

Se les aplicó un número incremental de pulsos eléctricos a cada una de las muestras con valores nominales de 400, 800 y 1600 pulsos, manteniendo fijos los parámetros de voltaje de descarga (5 kV), capacitancia (0,66 μF), forma del pulso (bipolar) periodo de descarga (5 s) y simetría entre pulsos (50%). La elección de estos parámetros se basa bajo los mismos criterios planteados en 4.2.

Al momento de carga y descarga de la celda de tratamiento se midió la temperatura de la muestra mediante un termómetro de proximidad infrarrojo con el fin de detectar el incremento de temperatura debido a la energía absorbida por la muestra y corroborar que no se lleguen a temperaturas superiores a 40°C sobre la cual se debe considerar el proceso como un tratamiento con efectos térmicos.

4.4 Metodología para extracción con solvente de pigmentos carotenoides

Para la extracción de los pigmentos carotenoides se traspasaron 900 μl de muestra a un tubo ependorf de 2 ml y se incorporaron 900 μl de tolueno p.a. a 20°C en triplicado para cada tratamiento. Se utilizó solvente a esta temperatura para minimizar el daño celular causado por el proceso de extracción. La elección de solvente se basó en la metodología descrita por Rodríguez-Amaya (2001) Bramley y cols. (1973). Se utilizó tolueno debido a su baja interferencia como blanco en la absorbancia UV-Vis en el rango de 350-550 nm y a que no tiende a formar emulsiones con la fase polar acuosa frente a agitación.

Posterior a la incorporación de solvente se agitaron los tubos ependorf mediante un equipo vortex Thermolyne Maxi Mix II 37610 (E.E.U.U.), a máxima velocidad por 30 s y se centrifugaron a 10.000 rpm x 10 min en una microcentrífuga Hermle Z 160M (Alemania), para lograr la separación de la fase acuosa y la orgánica.

Se separó la fase orgánica para cada una de las muestras mediante una micropipeta con punta de 500 μ l, Finalmente se taparon los tubos con extracto para evitar su contacto con la luz hasta su análisis por absorbancia.

El diagrama de bloques de la metodología de extracción y análisis se anexa en la figura 4.3

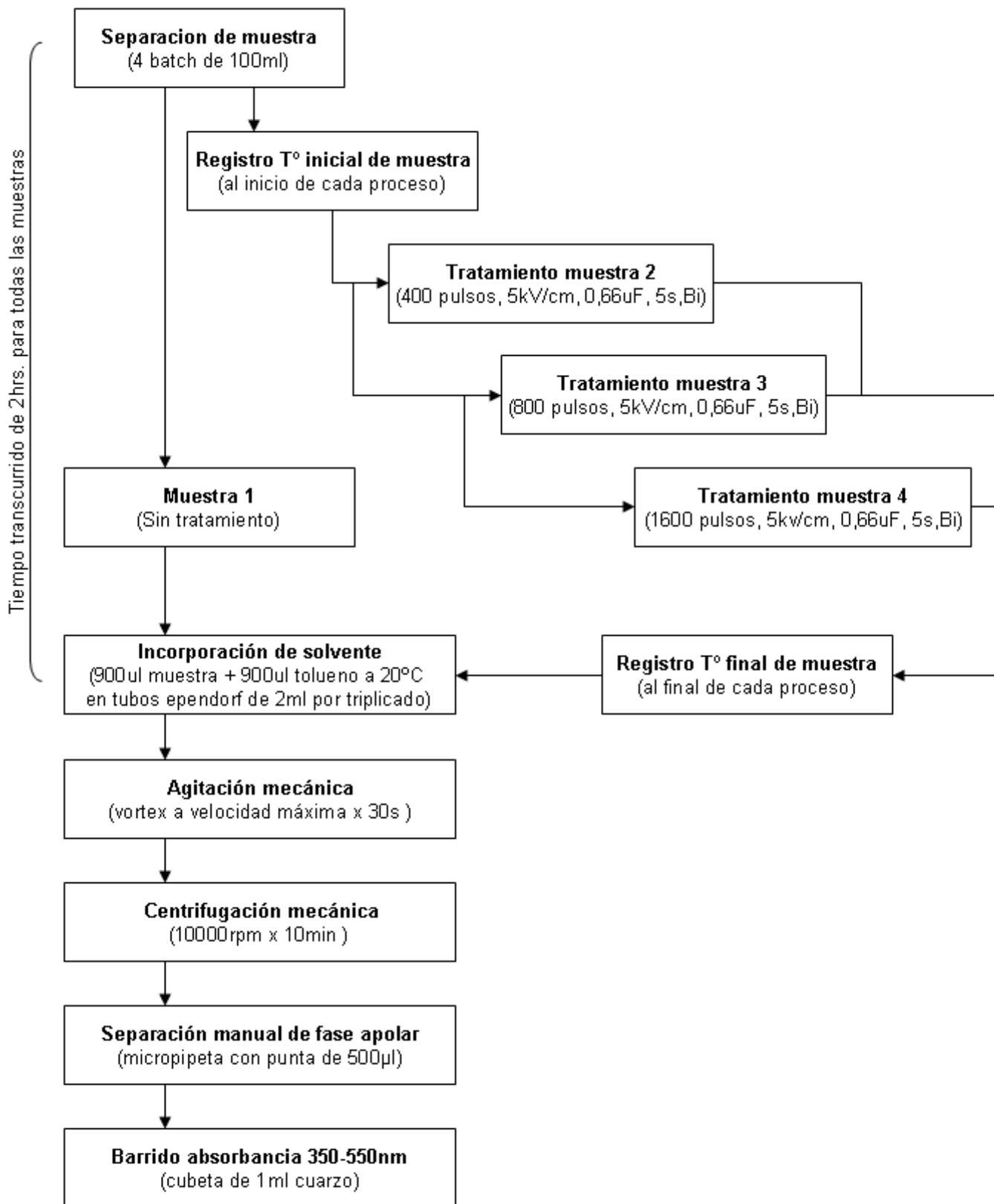


Figura 4.3: Diagrama de bloques para tratamiento de muestras para cuantificación por absorbancia.

4.5 Metodología de análisis para cuantificación mediante espectroscopía UV-Vis

Los extractos carotenoides fueron analizados mediante barrido de absorbancia en el rango de los 350 y 550 nm acorde a la metodología de ensayo descrita por Rodríguez-Amaya (2001) y Bramley y cols. (1973) en un equipo Jenway 6715 UV-Vis Spectrophotometer (Reino Unido). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 ml y una resolución de adquisición de 1 nm por punto.

5. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS TRATADAS POR PULSOS ELÉCTRICOS

5.1 Efecto de los pulsos eléctricos a nivel celular microscópico

El proceso de pulpeado mediante "cutter genera un gran deterioro a nivel de macroelementos como vasos capilares y tejido estructural, no tanto así a nivel celular (ver figura 5.1a-b). El proceso genera la inclusión de pequeñas burbujas de aire en la muestra (ver figura 5.1b), las que se deben reducir a un mínimo antes de tratar la muestra, ya que su tendencia a flotar generan una gradiente de conductividad dentro de la celda mientras se trata la muestra, evitando una descarga homogénea en la totalidad muestra.

En la secuencia mostrada en la figura 5.3a-e se puede observar que hubo un deterioro progresivo de la estructura celular, tanto de la membrana como de su estructura interna, a mayor número de pulsos aplicados manteniendo el potencial de descarga constante en 5kV/cm y pulsos bipolares. El deterioro, según lo observado, comienza con la reconfiguración de los componentes internos de la célula sin una ruptura aparente de la membrana. En algunas células se reconfigura e indefine su estructura interna y a mayor número de pulsos se visualizan 'aureolas' translucidas cercanas a la pared interna de la membrana celular (ver figura 5.2). Se atribuye la reconfiguración interna a los fenómenos de tensión y polarización electroquímica propios del tratamiento, pero no se logra explicar del todo la formación 'aureolas' cercanas a la membrana. Se propone que son causa de un efecto de repulsión por polarización entre el líquido intracelular y el líquido extracelular debido a un intercambio parcial de iones, posiblemente de una ruptura reversible previa de la membrana.

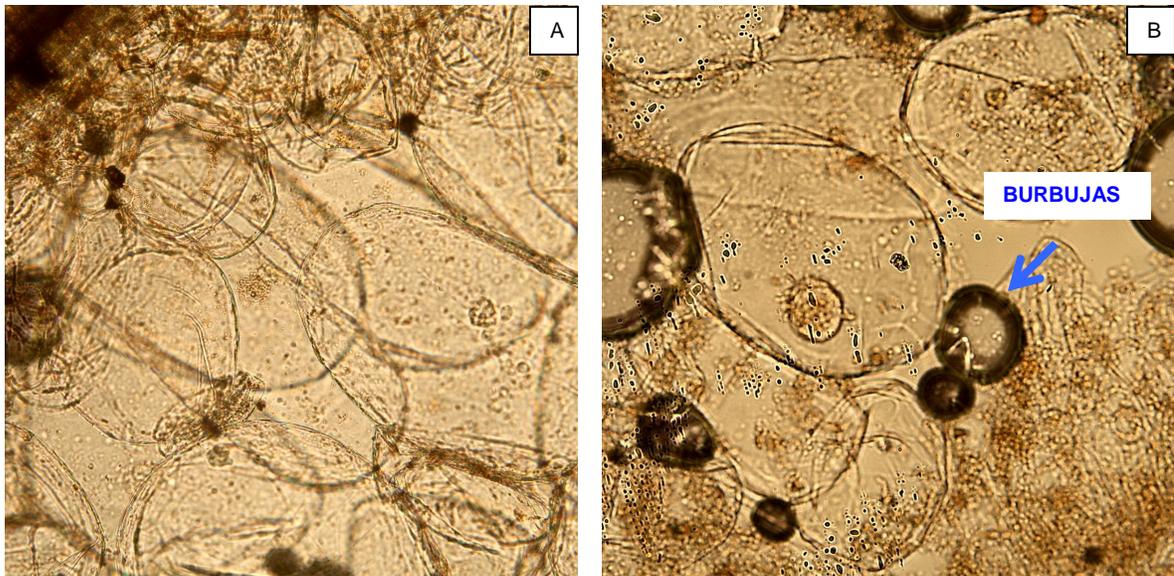


Figura 5.1:

- a) Muestra de tejido previo a pulpeado, vasos capilares y estructura celular casi intacta (10x)
- b) Muestra posterior al pulpeado. Ausencia de macroelementos, inclusión de burbujas de aire, pero membranas celulares casi en su totalidad intactas. (10x)

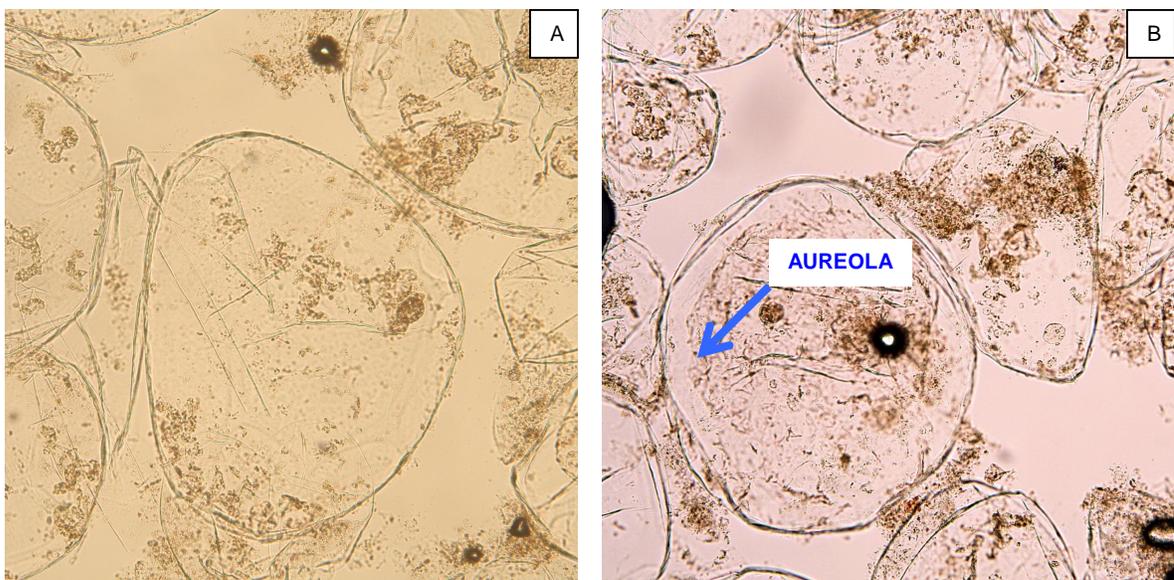


Figura 5.2:

- a) Reconfiguración celular interna producido por el tratamiento de pulsos eléctricos (10x 200p)
- b) Aureola en la cercanía de la membrana celular al aumentar el número de pulsos de tratamiento (10x 800p)

A medida que aumenta el número de pulsos de tratamiento aplicados se genera un mayor número de rupturas celulares irreversibles (**ver descripción del deterioro progresivo acorde a número de pulsos en figuras 5.3a-e**).



Figura 5.3.a:
Pulpa sin tratamiento (10x),
Estructuras celulares internas aun definidas y paredes celulares con algo de deterioro por proceso de molienda pero en general intactas.

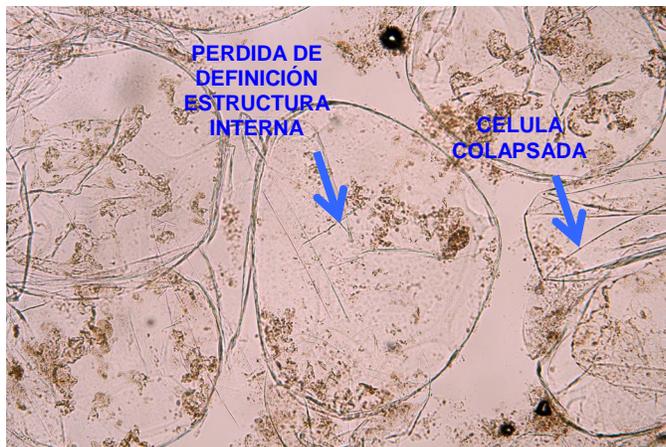


Figura 5.3.b:
Pulpa con 200 pulsos de tratamiento a 5kV/cm (10x).
Estructuras celulares internas pierden definición, paredes celulares con deterioro visible por efecto de la electroporación.

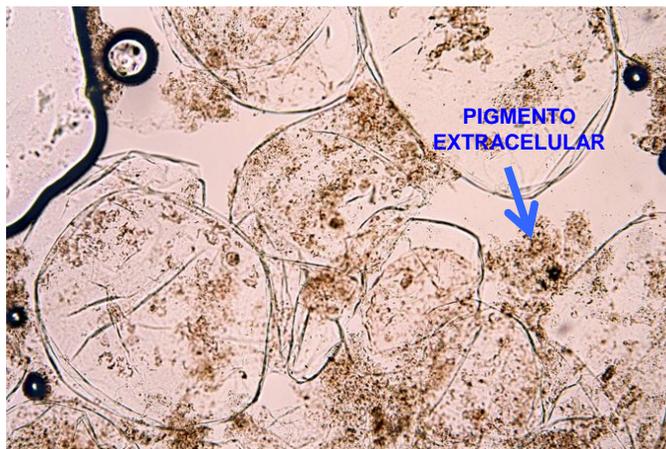


Figura 5.3.c:
Pulpa con 400 pulsos de tratamiento a 5kV/cm (10x).
Deterioro en paredes celulares incrementado por proceso de electroporación, se evidencia mayor cantidad de pigmento en el medio extracelular.

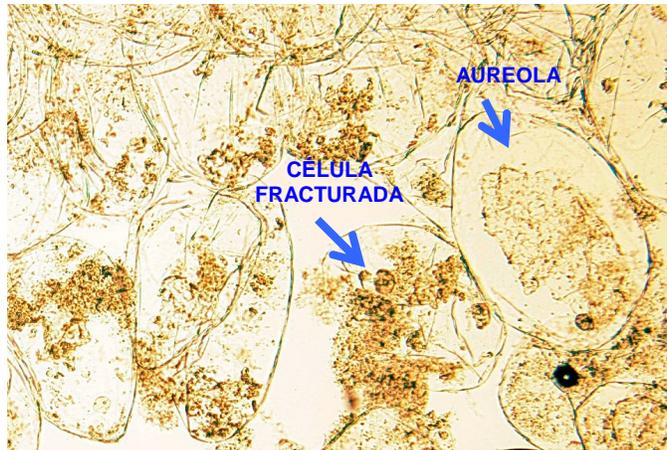


Figura 5.3d:
Pulpa con 800 pulsos de tratamiento a 5kV/cm (10x). Deterioro en paredes celulares es evidente se aprecian fracturas en algunas células dados por proceso de electroporación, se evidencia fenómeno de aureolas en contenido intracelular.

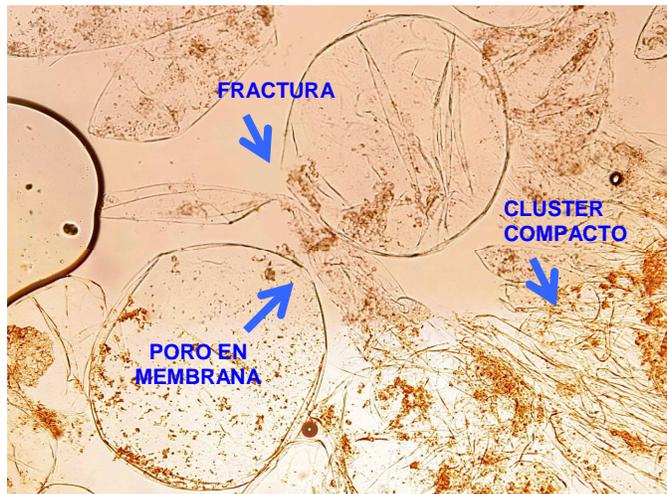


Figura 5.3.e:
Pulpa con 1600 pulsos de tratamiento a 5kV/cm (10x). Deterioro de la estructura celular es completo y en casi todas las células. Se aprecia la formación de “clusters” compa de paredes celulares

Esto supone que el número de pulsos aplicados es acumulativo en torno a los efectos de ruptura celular si se mantienen constantes los demás parámetros operacionales del equipo, y se atribuye a efectos de debilitación progresiva por compresión de la membrana. Otro aspecto interesante es el aumento progresivo, acorde al número de pulsos aplicados, de agregados celulares ('clusters') en los cuales muchas células se unen entre si formando racimos cada vez mayores (ver figura 5.4). Se propone que estos "clusters" aumentan de tamaño y cantidad debido a efectos de polarización residual de la membrana en las células en suspensión, y se les atribuye un efecto coadyuvante del proceso de ruptura celular debido a que existen células con una evidente ruptura por compactación al interior del aglomerado (ver figura 5.5). Esto puede explicar los resultados obtenidos en la mejora de rendimiento de extracción acorde se aumenta el número de pulsos (ver sección 5.2) y se le atribuye su efecto a un mecanismo coadyuvante entre la disminución progresiva del espesor

de la membrana celular en la dirección del campo eléctrico aplicado y la compresión de las células al interior del 'cluster' lo que genera finalmente la ruptura de las células en el centro del agregado.

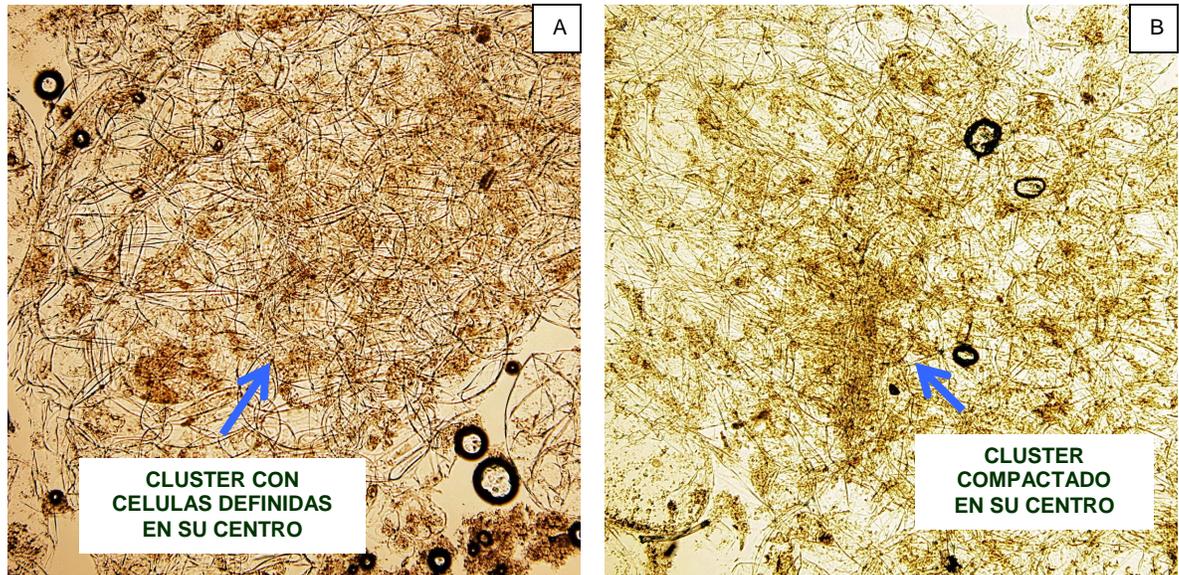


Figura 5.4: a) 'cluster' sin colapsar estructuras celulares aun definidas en el centro (5x 400p. 5kV/cm)
b) 'cluster' colapsado estructuras celulares no definidas en el centro (5x 1600p. 5kV/cm)

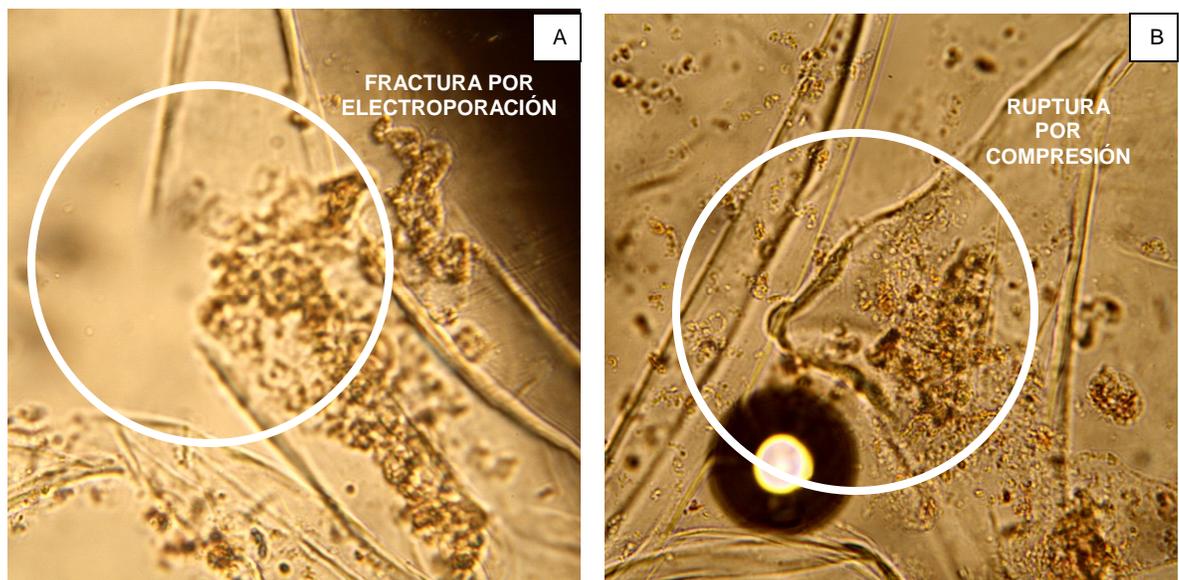


Figura 5.5: a) Detalle fractura típica causada por electroporación (40x 800p. 5kV/cm)
b) Detalle de ruptura causada por la compresión en el interior de los 'clusters' en una membrana previamente debilitada. (40x 800p. 5kV/cm)

5.2 Resultados de cuantificación comparativa de extracción con solvente de pigmentos carotenoides en muestras tratadas por pulsos eléctricos

5.2.2 Resultados experimentales absorbancia UV-VIS

Se obtuvo de forma experimental un barrido de absorbancia con 3 'peaks' en las longitudes de onda de 458, 486 y 520 nm y un valle en torno a los 435 nm (ver gráfico 5.1), este último causado probablemente por el β -caroteno. Esto concuerda a lo tabulado por Bramley et cols. (1973) para una solución que contiene β -caroteno, licopeno y luteína como componentes primarios en tolueno como solvente.

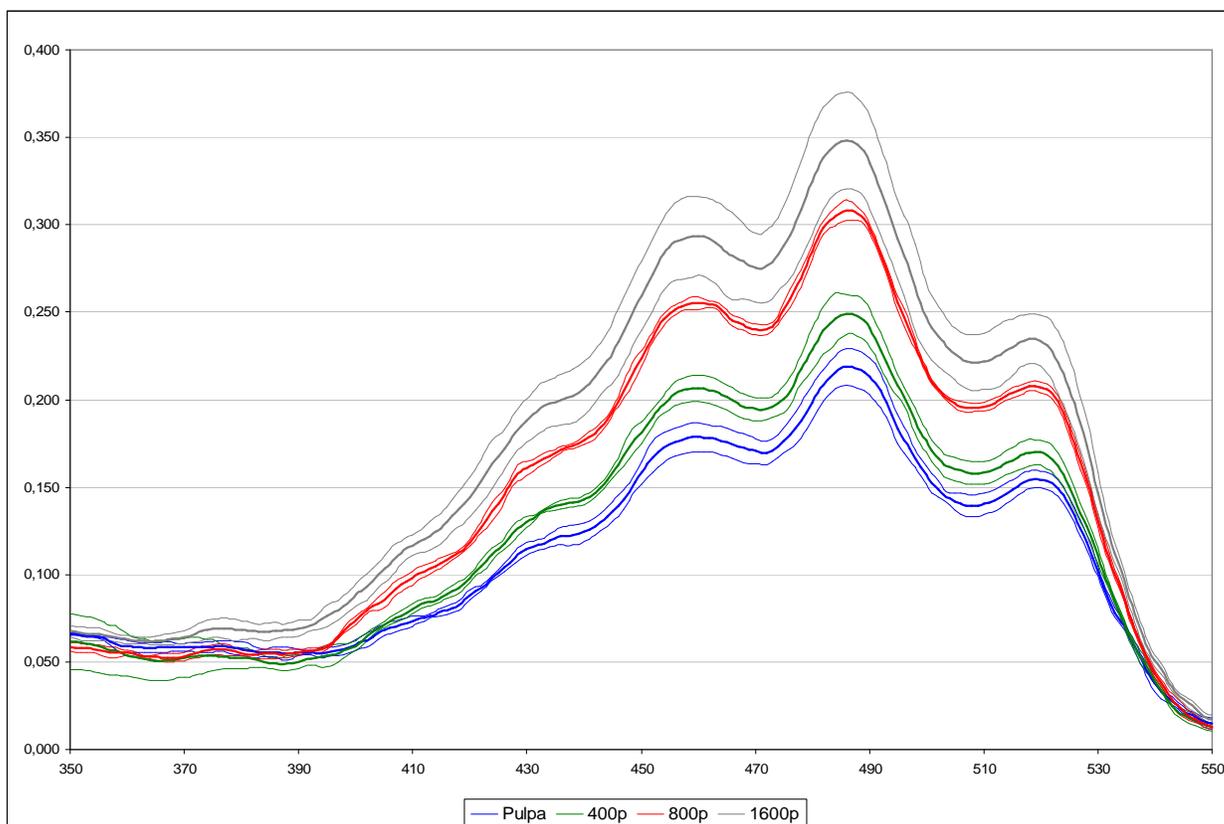


Gráfico 5.1: Absorbancia vs. longitud de onda (350-550 nm) para extractos carotenoides en tolueno desde pulpa de tomate sin tratar y tratamientos a 5 kV/cm con 400, 800 y 1600 pulsos bipolares (línea promedio más desviación estándar para n=3)

La amplitud de los 'peaks' en cada caso fue aumentando acorde al número de pulsos de tratamiento aplicado (ver tabla 5.1), esto debido a la mayor concentración de pigmentos solubles, lo cual indica un incremento en los rendimientos de extracción mediante el uso de un tratamiento previo de pulsos eléctricos de alta intensidad, pudiendo relacionarse con el incremental daño celular observado en microscopia (capítulo 5.1).

Tabla 5.1: Absorbancia promedio en longitudes de onda 'peak' (λ_{max}) para los distintos tratamientos (n=3)

λ_{max} (nm)	Pulpa	400 pulsos	800 pulsos	1600 pulsos
435	0,121 \pm 0,004	0,139 \pm 0,002	0,169 \pm 0,002	0,199 \pm 0,014
458	0,178 \pm 0,008	0,206 \pm 0,007	0,254 \pm 0,003	0,293 \pm 0,024
486	0,219 \pm 0,011	0,249 \pm 0,011	0,380 \pm 0,006	0,348 \pm 0,028
520	0,154 \pm 0,005	0,170 \pm 0,007	0,207 \pm 0,003	0,234 \pm 0,015

Si se tabula porcentualmente el incremento promedio en los 'peaks' de absorbancia de las muestras tratadas utilizando la absorbancia de la pulpa sin tratamiento como base, se obtienen incrementos del orden de 14% a 60% para los tratamientos en el rango de 400 pulsos a 1600 pulsos (ver tabla 5.2). Aumento el cual se puede relacionar directamente al aumento de concentración de pigmentos carotenoides totales extraídos, siempre cuando se considere que el extracto cumple con la linealidad propuesta por la ley Beer-Lambert para la absorbancia y concentración molar, y el promedio de los cuatro 'peaks' seleccionados sean representativos del producto en todos el espectro de los tratamientos.

Tabla 5.2: Porcentaje de incremento de absorbancia a longitudes de onda 'peak' (λ_{max}) para los distintos tratamientos con respecto a la muestra sin tratar (n=3)

λ_{max} (nm)	400 pulsos	800 pulsos	1600 pulsos
435	15%	40%	64%
458	16%	43%	65%
486	14%	41%	59%
520	10%	34%	51%
% Promedio	14 \pm 2%	40 \pm 4%	60 \pm 6%

Para estimar el grado de deterioro de los pigmentos carotenoides producidos por el tratamiento mediante pulsos eléctricos, se realizó un análisis sobre la migración entre los valores de absorbancia ‘peak’ y el número de pulsos de tratamiento aplicados, siendo de particular interés la migración desde el ‘peak’ III (520 nm) y II (486 nm) hacia el ‘peak’ I (458 nm) debido a su relación cercana con el deterioro del trans-licopeno hacia sus derivados cis (ver figura 5.3). Para esto se consideró a la sumatoria de las absorbancias ‘peak’ como el 100% atribuyéndoles una parte porcentual a cada ‘peak’. Posteriormente se sacó la diferencia de composición porcentual entre la muestra sin tratamiento y los posteriores tratamientos de lo que se obtuvo la gráfica 5.2 en donde se muestra el desplazamiento porcentual de los valores de absorbancia desde un ‘peak’ a otro acorde se aumenta el número de pulsos de tratamiento.

Existe un incremento de la migración de los ‘peaks’ II y III hacia el ‘peak’ I a medida que se aumenta el número de pulsos, lo que implica que existe un deterioro, aunque mínimo, de los pigmentos carotenoides y una alteración a nivel molecular inducida por el proceso de pulsos eléctricos.

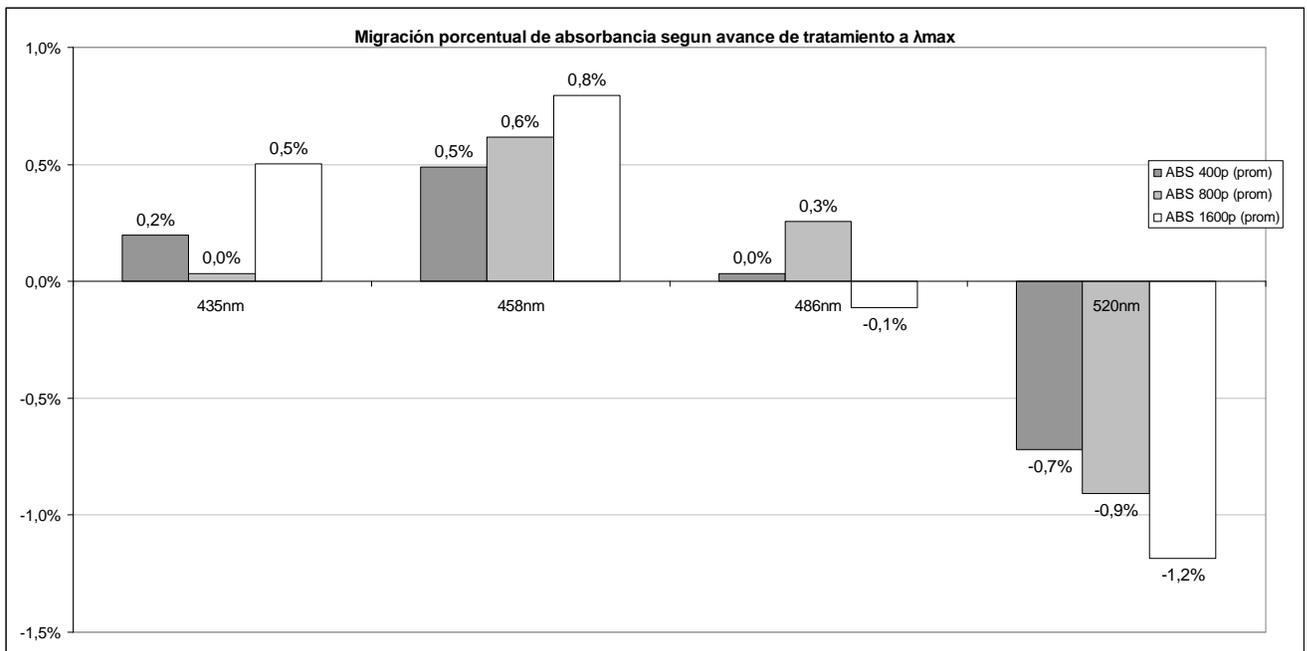


Gráfico 5.2: Migración porcentual de absorbancia a longitudes de onda ‘peak’ (λ_{max}) para los distintos tratamientos con respecto a la muestra sin tratar ($n=3$, 5 kV/cm)

5.2.3 Incremento de temperatura del sistema

El incremento de temperatura de las muestras para los distintos tratamientos se adjunta en el gráfico 5.3

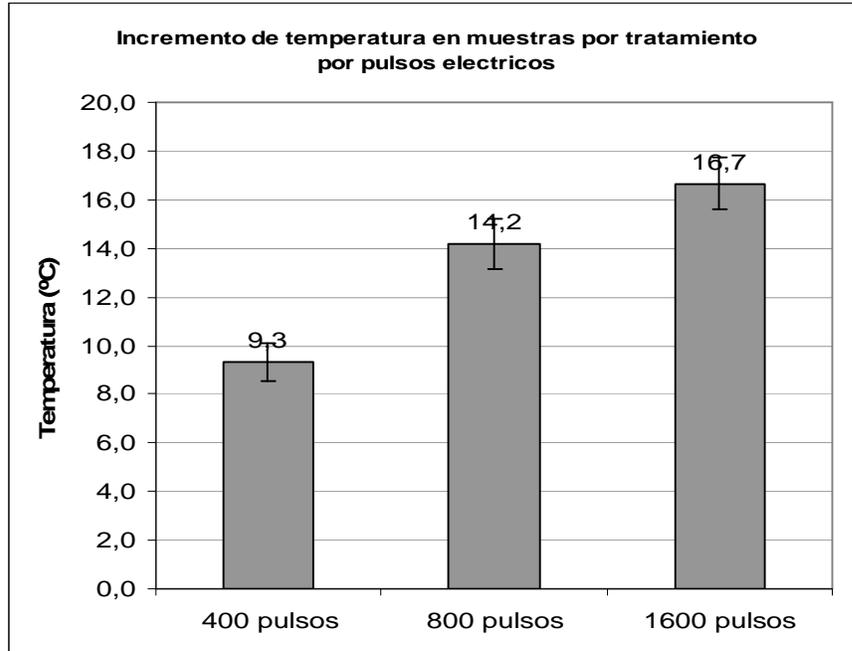


Gráfico 5.3: Diferencia de temperatura en muestras post tratamiento con pulsos eléctricos de alta intensidad (n=3).

No hubo un incremento por sobre los 40 °C para ninguno de los tratamientos, por lo que se puede considerar como un tratamiento no térmico en el cual los efectos de calentamiento óhmico no involucran parte importante del deterioro celular, eso considerando que este factor depende de la energía y periodo de descarga utilizados.

5.2.4 Energía de descarga del sistema

La energía de descarga por pulso para el tratamiento realizado se puede obtener desde los pulsos registrados en el osciloscopio (ver figuras 5.6a y 5.6b) obteniendo el área bajo la curva del pulso en cuestión.

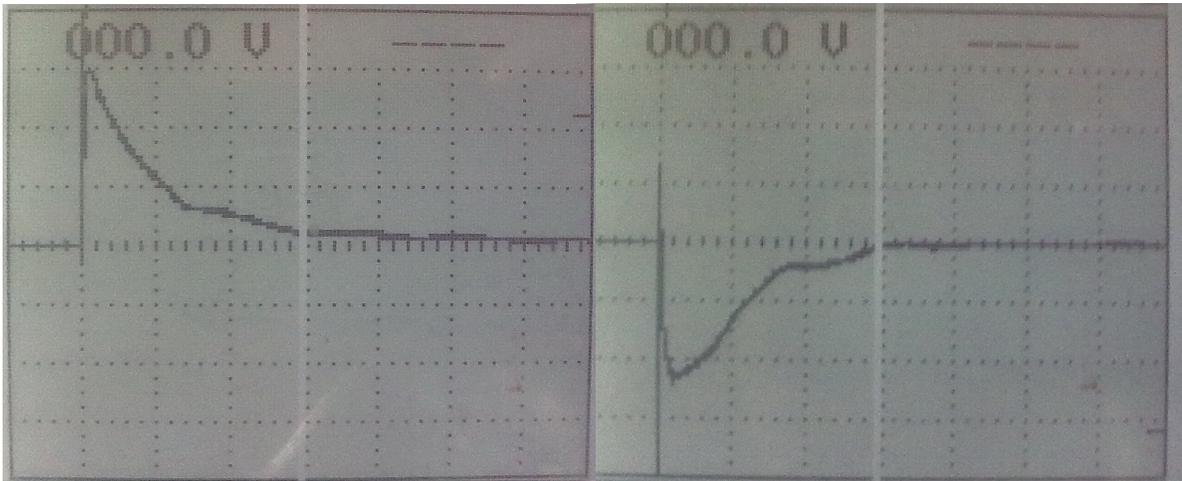


Figura 5.6: Descarga hacia muestra a 0,66 uF bipolar, 15 kV y 10 kΩ (V:2000 V/div, t:10 ms/div)

Se pueden ver algunas deformaciones en los pulsos, los que se supone provienen de la capacitancia e inductancia parasita de la celda de tratamiento y sus conectores.

Si se asume como un pulso de descarga característico de un circuito RC se puede expresar la energía descargada en el tiempo mediante la ecuación:

$$E = \frac{CV^2}{2}$$

Ec. 5.1

Donde:

E = energía [W·s o J]

C = capacitancia [F]

V = voltaje 'peak' [V]

Pero este tipo de pulso se ajusta mejor a un pulso de descarga por arco de plasma, los cuales se pueden calcular mediante el modelo de descarga estandarizado DO-160E WF4 el cual se define como:

$$E = \left(\frac{1}{3} \times \frac{V^2}{R} \times t_1 \right) + \left[\left(\frac{V^2 t}{-2R} \right) \times \left(e^{-\left(\frac{2t_2}{t}\right)} - e^{-\left(\frac{2t_1}{t}\right)} \right) \right]$$

Ec. 5.2 (Vishay, 2012)

Donde:

E = energía [W·s or J]

V = voltaje 'peak' [V]

R = resistencia [Ω]

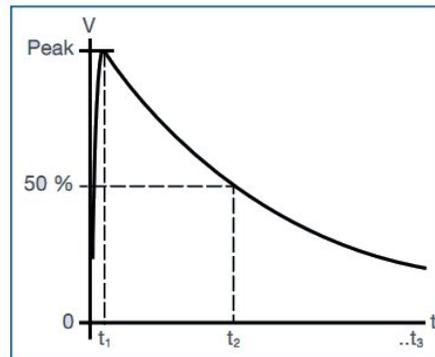
t1 = tiempo hasta alcanzar voltaje 'peak' [s]

t2 = tiempo hasta el 50 % del voltaje 'peak' [s]

t3 = tiempo hasta decaimiento total del voltaje [s]

τ = ratio de decaimiento exponencial

$$t = \frac{-t_2 - t_1}{\ln(0,50)}$$



Ec. 5.3

(Vishay, 2012)

Lo cual reemplazando para los pulsos de la figura 5.6 se obtienen valores de 10,07 [J] y 7,41 [J] por pulso, y un valor promedio de $8,74 \pm 1,88$ [J/pulso] lo cual entrega los valores tabulados en 5.3 de energía total incorporada a la muestra y la gráfica 5.4 que relaciona la energía total utilizada en el tratamiento vs. el aumento porcentual de los 'peaks' de absorbancia la cual a su vez esta ligada a la concentración de extracto solubilizado si el extracto cumple la ley de Beer-Lambert.

Tabla 5.3: Energía total aplicada al sistema en los distintos tratamientos (n=2) y porcentaje de incremento de absorbancia en los extractos en comparación a la muerta sin tratamiento (n=3)

Nº Pulsos	Energía total incorporada a la muestra [J]	Porcentaje de incremento en absorbancia
400	3496±752	14±2%
800	6992±1505	40±4%
1600	13984±3009	60±6%

Pese a que requiere un mayor número de datos para obtener resultados significativos en torno a la tendencia, se infiere que existe un incremento porcentual del rendimiento de extracción acorde se aumenta el número de pulsos de pretratamiento.

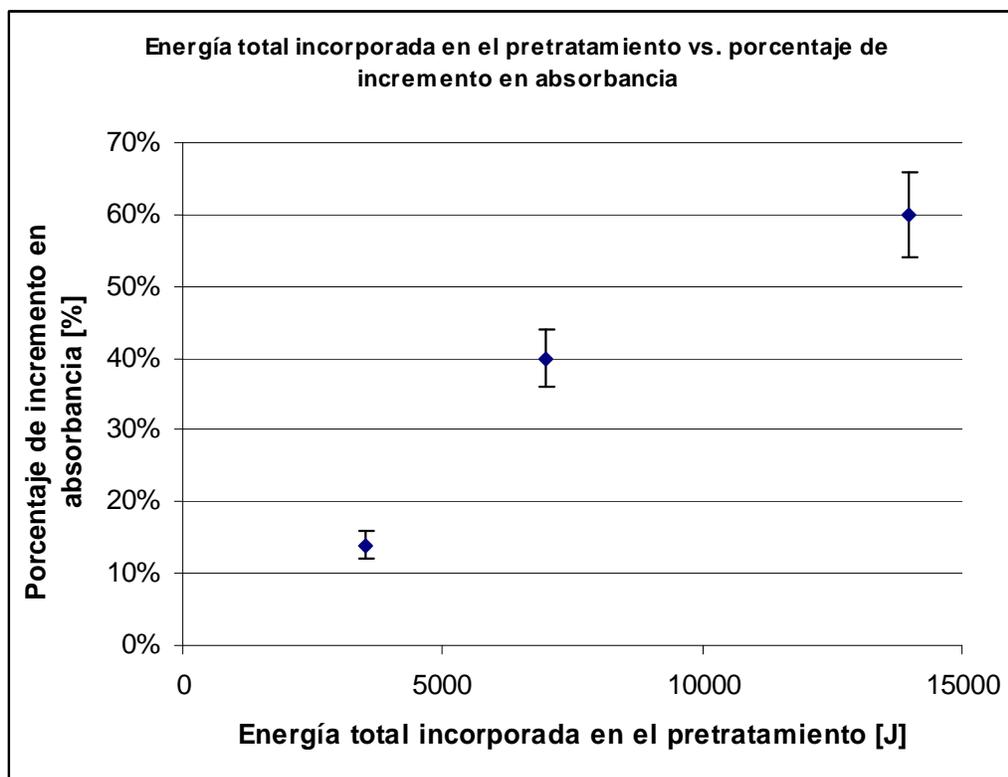


Gráfico 5.4: Energía total incorporada en el pretratamiento vs. porcentaje de incremento en absorbancia

Para analizar la eficiencia energética del proceso se estandarizaron los datos de la tabla 5.3 representándolos como porcentaje de incremento de absorbancia obtenidos por cada kilojoule de energía aplicada a la muestra como pretratamiento [%ABS/kJ], con lo que se obtuvo la tabla 5.4 y la gráfica 5.5.

Tabla 5.4: Energía total aplicada al sistema en los distintos tratamientos (n=2) y porcentaje de incremento de absorbancia por kJ de energía aplicada a la muestra en el pretratamiento (n=3)

Pulsos totales de tratamiento	Energía total aplicada [kJ]	Porcentaje de incremento en absorbancia por kJ de energía aplicada [%ABS/kJ]
400	3,496±0,752	4,0±0,6%
800	6,992±1,505	5,7±0,6%
1600	13,984±3,009	4,3±0,4%

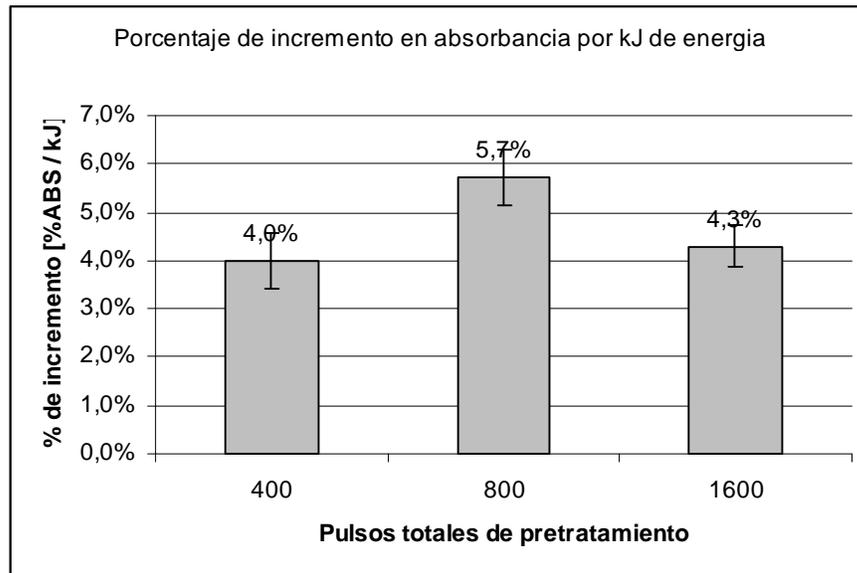


Gráfico 5.5: Porcentaje de incremento en absorbancia con respecto a pulpa vs. La energía total aplicada a la muestra

Estos datos sugieren que al variar el número de pulsos aplicados a la muestra existe un valor óptimo para ayudar la extracción (en este caso los 800 pulsos de tratamiento), pero se requiere de un mayor análisis experimental y menor granularidad entre los números de pulsos para que estos resultados posean relevancia estadística concluyente. También se debe considerar su correlación con otros factores tales como intensidad del campo en el tratamiento, composición química de la muestra, temperatura de trabajo, pH, potencial iónico/conductividad, tamaño celular entre otros, lo que se estima que son característicos tanto del equipo de pulsos eléctricos utilizado y muestra a tratar.

6. CONCLUSIONES

- Se cumple la hipótesis ya que se logró diseñar y construir un equipo para el tratamiento mediante pulsos eléctricos de alta intensidad, para muestras fluidas por batch y su aplicación en pulpa de tomate, mejorando los rendimientos de extracción por solvente de pigmentos carotenoides, mediante un pretratamiento con pulsos eléctricos de alta intensidad.
- El equipo es capaz de tratar 50 ml de muestra fluida a intensidades de campo de 1 a 15 kV/cm con una ráfaga de pulsos tanto monopolares como bipolares y a intervalos programables, por lo que se cumplió con las expectativas de diseño de forma exitosa.
- El tratamiento mediante pulsos eléctricos en todos los rangos de pulsos probados, generó microporación celular de la pulpa de tomate a intensidades de 5 kV/cm y pulsos bipolares.
- Existe un aumento en el rendimiento de extracción, mediante solvente, de los pigmentos carotenoides en solución desde pulpa de tomate, si se aplica un pretratamiento de pulsos eléctricos a 5 kV/cm de intensidad. Se sugiere que existe una relación no lineal entre el incremento en la eficiencia energética para la obtención del extracto y un mayor número de pulsos aplicados si se conservan los otros parámetros operacionales constantes.
- Debido a lo observado en microscopía óptica y en la curva de rendimiento de extracción se sugiere que existe un efecto coadyuvante a la ruptura celular a mayor número de pulsos aplicados, debido a un efecto conjunto entre el debilitamiento progresivo de la membrana celular y el efecto de compresión otorgado por la formación de “clusters” celulares.

- Acorde a los resultados obtenidos existe una alteración molecular de los pigmentos extraídos acorde se incrementa el número de pulsos aplicados. Pese a que se detectaron valores bajos de deterioro (menores al 1,5% de migración en los 'peaks' de absorbancia para todos los tratamientos), se requiere de mayor investigación para cuantificar de forma certera el grado de deterioro que sufren los pigmentos por este tipo de tratamiento y poder contrastarlo con procesos de extracción alternativos al método propuesto.
- Pese a la efectividad en el diseño del equipo a nivel de laboratorio, existen algunas limitaciones y desventajas de este tipo de diseño como por ejemplo la constante mantención del sistema de conmutación el cual se ve afectado por la corrosión y evaporación parcial de sus electrodos con el uso. También existe un problema con el escalamiento del equipo, ya que las estrategias de diseño utilizadas funcionan de forma adecuada a escala de laboratorio pero no son prácticas a dimensiones superiores o en experimentos que requieren del tratamiento continuo de muestra. Estos son actualmente desafíos tecnológicos para poder implementar a gran escala de forma segura y predecible este tipo de tratamiento por pulsos eléctricos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

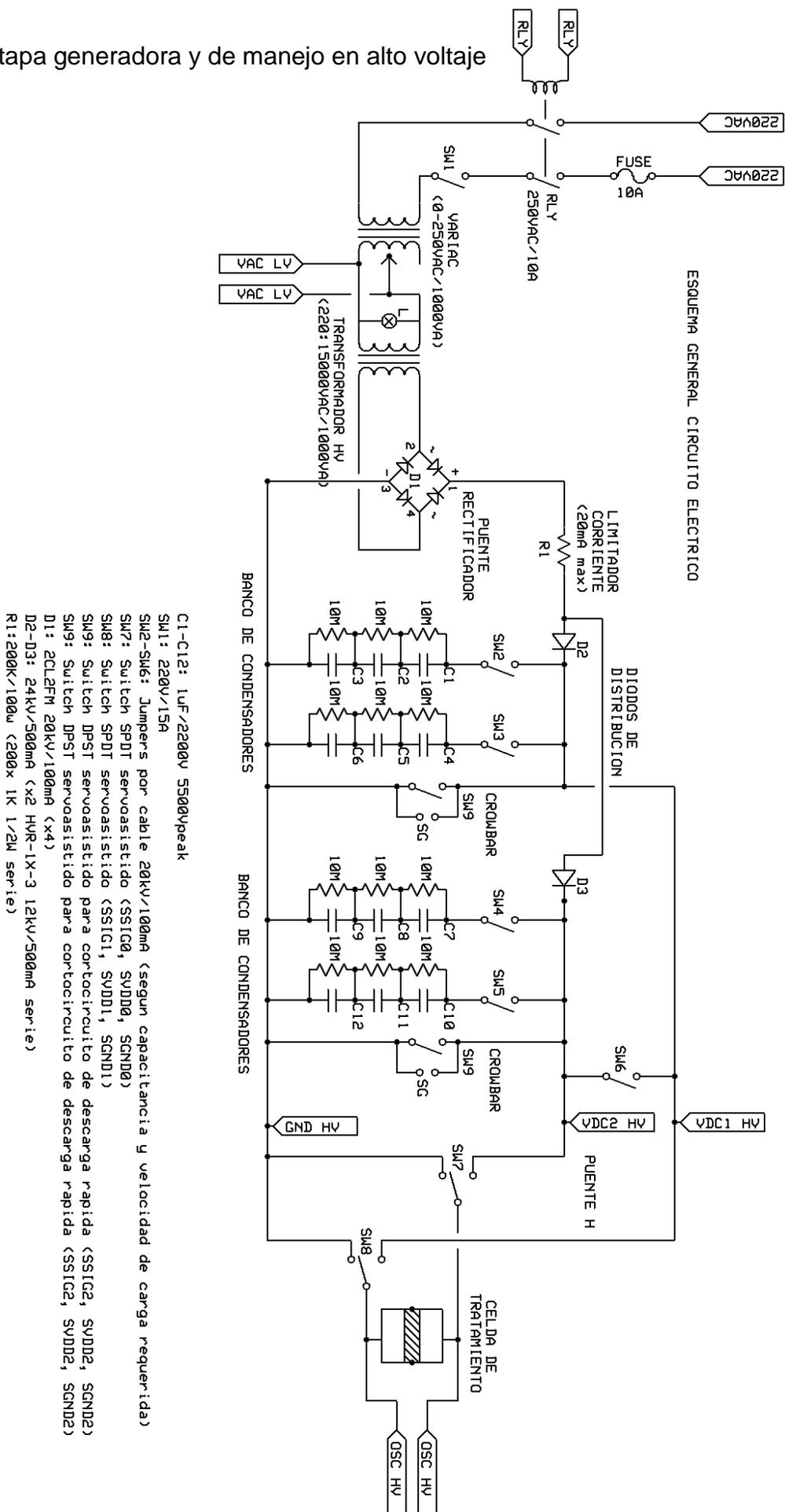
- Aràndiga, Gemma y Sonia Díaz. Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial. 2008. [citado 2010]. Disponible en la web: < <http://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/5544>>.
- Baek, Ju Won, Dong-wook Yoo, and Heung-geun Kim. High-Voltage Switch Using Series-Connected IGBTs. IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLICATIONS 37, 2001, 1832-1839.
- Barbosa-Cánovas G. Preservation of foods with pulsed electric fields. Academic Press, 1999.
- Barbosa-Cánovas G., Tapia M., Cano M. Novel food processing technologies. CRC Press, 2005.
- Beverly, R.E. Application Notes for Aqueous-Electrolyte Resistors. Construction 2004, 2008, 1-21. Disponible en la web: <<http://www.reb3.com/docs.html>>.
- Bramley, P M, B H Davies, and Averil F Rees. Colour Quenching by Carotenoids. LIQUID SCINTILLATION COUNTING 3, 1973, 76-85.
- Cardona, Eliana, Luis Rios, and Gloria Restrepo. Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicum esculentum*). Vitae 13, 2006, 44-53.
- Chang, D C. Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. Biophysical Journal 56, 1989, 641-652.
- Chen, J, J Shi, S Xue, and Y Ma. Comparison of lycopene stability in water- and oil-based food model systems under thermal- and light-irradiation treatments. LWT Food Science and Technology 42, 2009, 740-747.
- Ciurlia, Loredana, Mauro Bleve, and Leonardo Rescio. Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicum esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. The Journal of Supercritical Fluids 49, July 2009, 338-344.
- Co., Fuji Electric Device. FUJI IGBT MODULES APPLICATION MANUAL. Fuji 2004, 95. [citado 2010]. Disponible en la web: <[http://w5jgv.com/hv-ps1/pdf/fuji_igbt_application_manual\(REH984\).pdf](http://w5jgv.com/hv-ps1/pdf/fuji_igbt_application_manual(REH984).pdf)>.
- DeVito, Francesca. Application of Pulsed Electric Field (PEF) Techniques in Food Processing. Chemical Engineering 2006, 116.

- Doevenspeck, H. Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen Systemen. German Patent, 1960. DE 1237541.
- Duniway. Breakdown Voltage vs . Pressure Paschen ' s Law and " The " Paschen Curve. Duniway 1889, 1889-1889.
- Eshtiaghi, M, and D Knorr. High electric field pulse pretreatment: potential for sugar beet processing. *Journal of Food Engineering* 52, 2002, 265-272.
- Gachovska, T K, M O Ngadi, and G S V Raghavan. Pulsed electric field assisted juice extraction from alfalfa. *Biosystems Engineering* 48, 2006.
- Guderjan, M, S Töpfl, A Angersbach, and D Knorr. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering* 67, 2004, 381-388.
- Gerster, H. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition* 16, 1997, 109-126.
- Gongoranieto, M, D Sepulveda, P Pedrow, G Barbosacanvas, and B Swanson. Food Processing by Pulsed Electric Fields: Treatment Delivery, Inactivation Level, and Regulatory Aspects. *LebensmittelWissenschaft undTechnologie* 35, 2002, 375-388.
- Grahl, T, and H Märkl. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 1996, 148-57.
- Ho, S.Y., and Mittal, G.S. (1996) Electroporation of cell membranes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 16: 349-362.
- Huang Kang, and Jianping Wang. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering* 95, November 2009, 227-239.
- Kai K., Baumann P., Buckow R. An iterative modelling approach for improving the performance of a pulsed electric field (PEF) treatment chamber. *Computers & Chemical Engineering* 37, February 2012, 48-63.
- Knorr, Dietrich, Alexander Angersbach, Mohamed N Eshtiaghi, Volker Heinz, and Dong-un Lee. Processing concepts based on high intensity electric field pulses y. *Trends in Food Science Technology* 12, 2001, 129-135.
- Lebovka, Nikolai I., Iurie Praporscic, Sami Ghnimi, and Eugene Vorobiev. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *Journal of Food Engineering* 69, July 2005, 177-184.

- López, Noelia, Eduardo Puértolas, Santiago Condón, Javier Raso, and Ignacio Alvarez. Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 90, January 2009, 60-66.
- ProChile. Ingredientes saludables determinan la compra de alimentos. 2009. [citado 2010]. Disponible en la web: <<http://www.prochile.cl/losrios/noticias.php?item=00000008058>>.
- Qin, Bai-Lin Qin Bai-Lin, Qinghua Zhang Qinghua Zhang, G V Barbosa-Canovas, B G Swanson, and P D Pedrow. Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms. 1994.
- Rodriguez-Amaya, Delia B. *A guide to carotenoid analysis in foods*. 1ra. edición [Campinas, SP., Brasil]: ILSI Press, 2001.
- Sale, A J, and W A Hamilton. Effects of high electric fields on microorganisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 163, 1968, 37-43.
- Sampedro, F, A Rivas, D Rodrigo, A Martinez, and M Rodrigo. Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk based beverage: Effect of process parameters. *Journal of Food Engineering* 80, 2007, 931-938.
- Shi, G et al. Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant. *Journal of Food Engineering* 80, 2007, 1060-1067.
- Vishay. Wirewound resistors – Pulse Handling Capabilities. Disponible en la web: <www.vishay.com/docs/49076/49076_vmn-pl0396-1103.pdf>.
- Wolinsky, Ira, James F Hickson, and Sanford C Garner. *Handbook of Nutraceuticals Functional Foods* Edited by MODERN NUTRITION. Nutrition and Cancer 2001.
- Zimmermann, U. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of physiology biochemistry and pharmacology* 105, 1986, 176-256.
- Zimmermann, U., G. Pilwat, and F. Riemann. Dielectric Breakdown of Cell Membranes. *Biophysical Journal* 14, 1974, 881-899.
- Zimmermann, U., G. Pilwat, F. Beckers, and F. Riemann. Effects of external electrical fields on cell membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 3, 1976, 58-83.
- 4hv.org.. 2010. [cita 2011]. Disponible en la web: <www.4hv.org>.

8. MATERIAL ANEXO

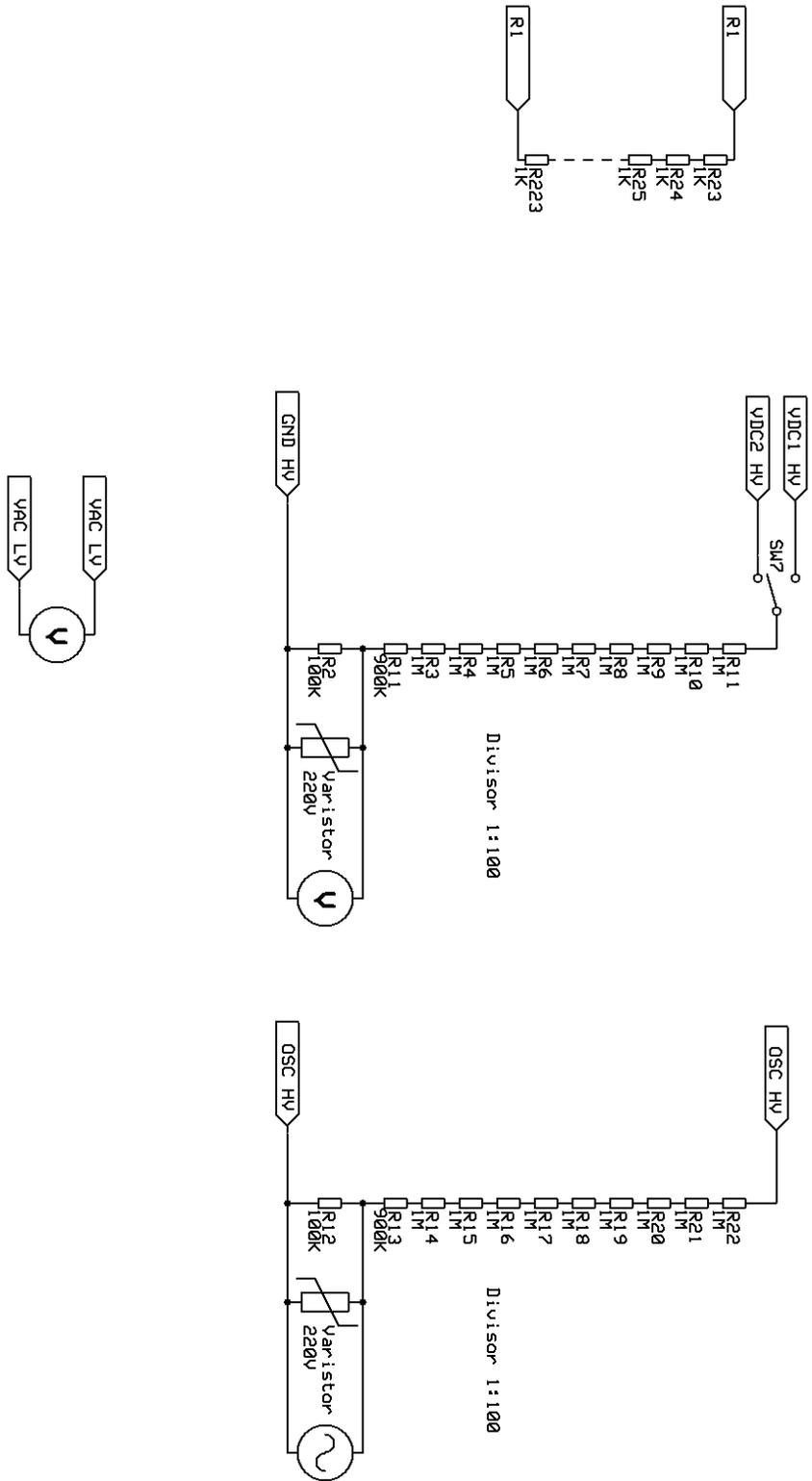
Anexo 3.2.4.1: Etapa generadora y de manejo en alto voltaje



Equipo HIPEF

Esquema general equipo y celda

Anexo 3.2.4.2: Conexión de circuitos para medición en alto voltaje



Equipo HIPEF

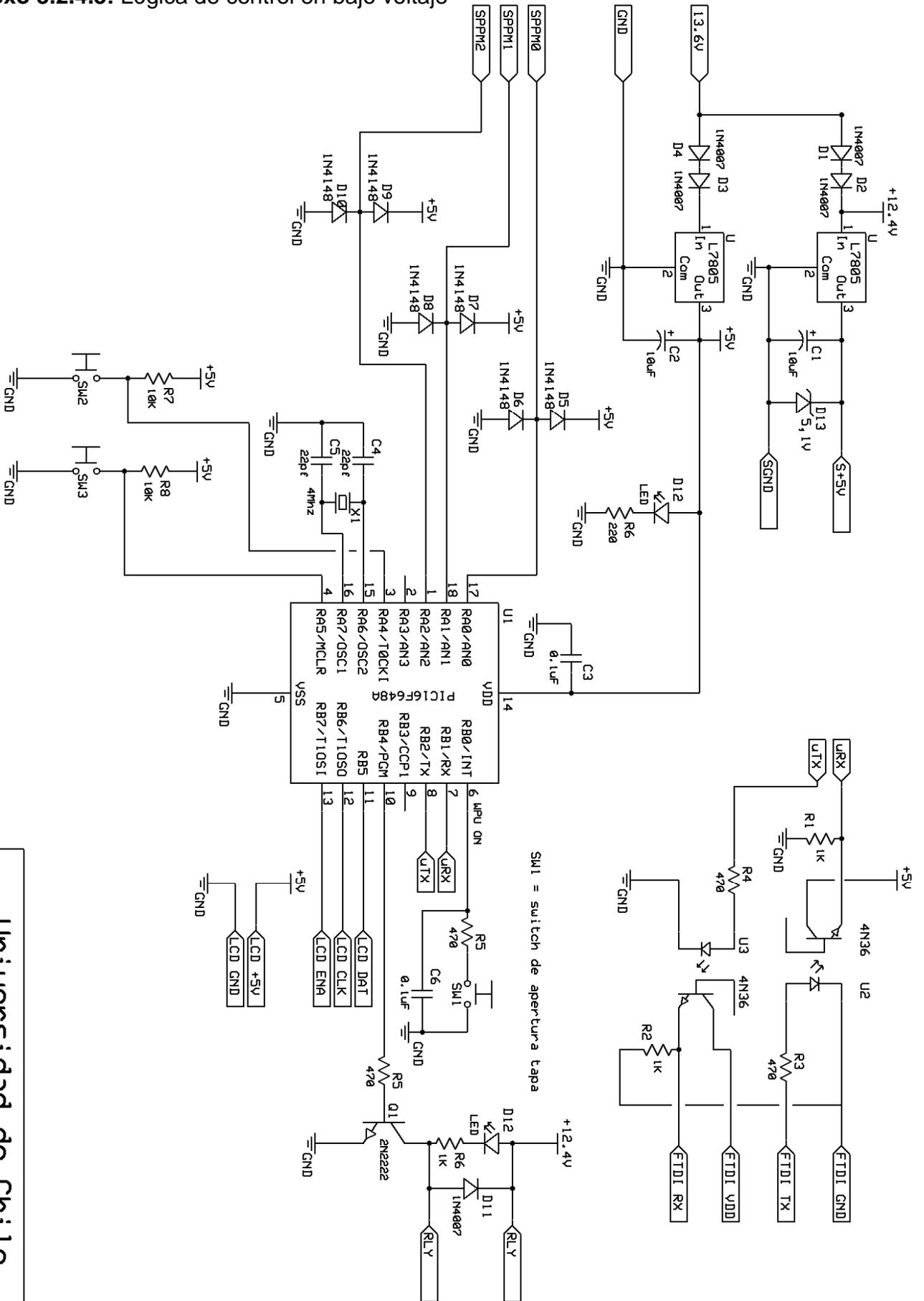
Esquema conexión instrumentos

Andres Glatzel

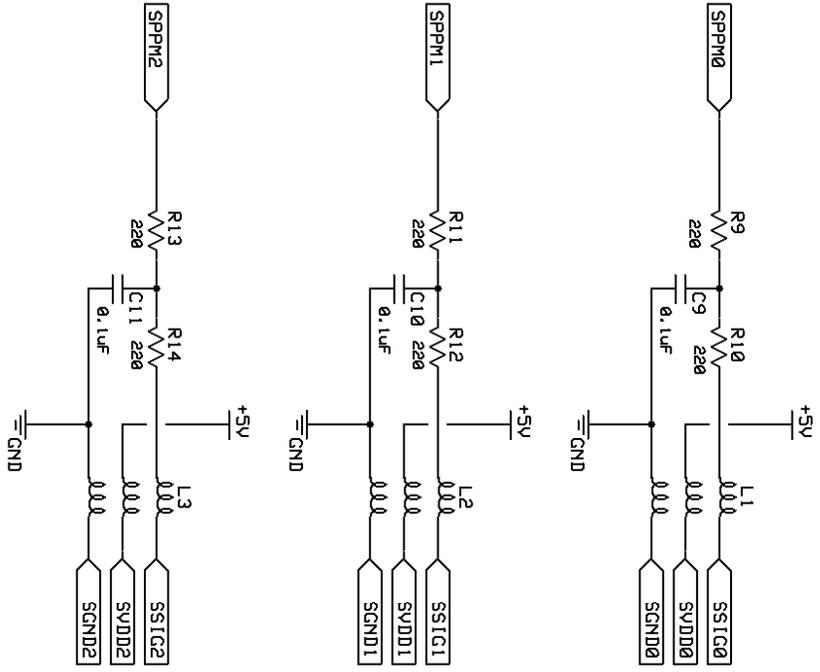
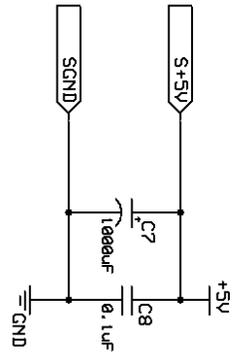
Rev 2.0
14-03-2011

Página 2/2

Anexo 3.2.4.3: Lógica de control en bajo voltaje



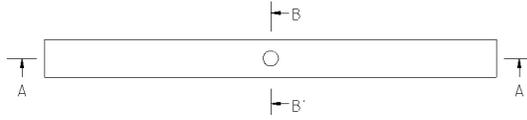
Anexo 3.2.4.4: Conexión de servomotores de control alto voltaje desde etapa lógica



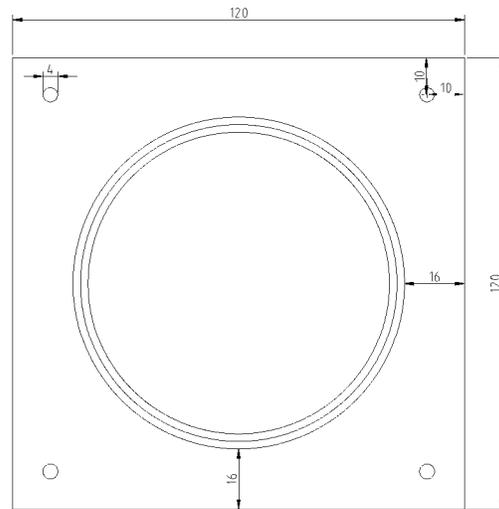
Anexo 3.2.5.10: Planos celda de tratamiento

Camara contenedora acrílico (1u)

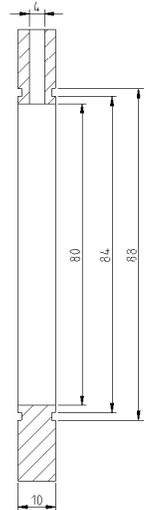
Vista Superior



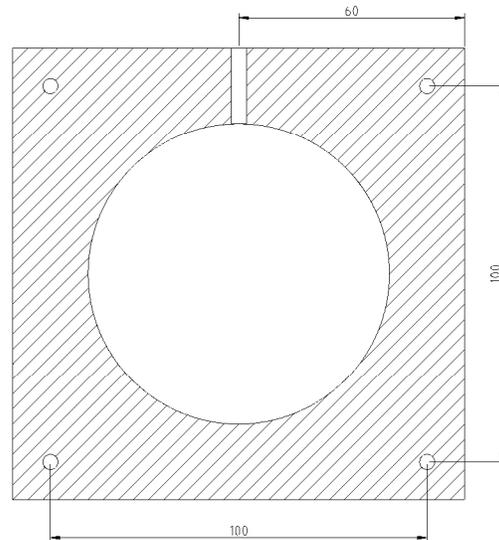
Vista Lateral



Corte B-B'



Corte A-A'

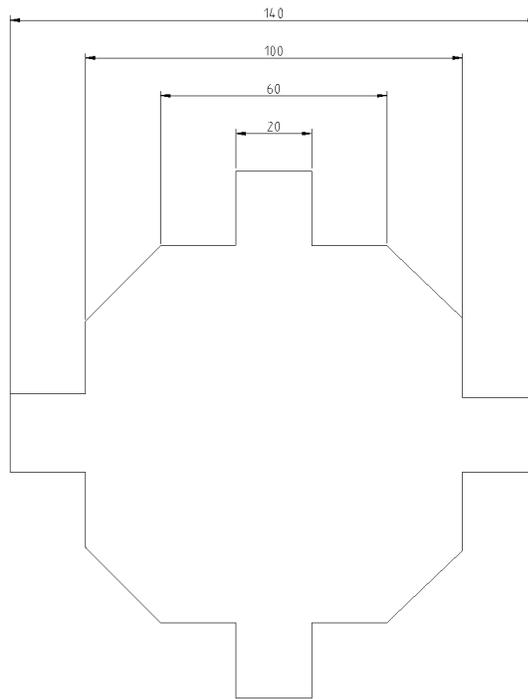


Electrodos lamina metálica (2u)

Vista Superior



Vista Lateral

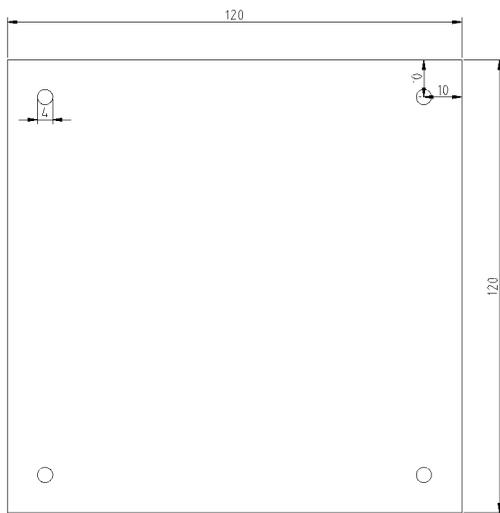


Tapas laterales acrílico (2u)

Vista Superior



Vista Lateral



Anexo 2: Tabla de tiempos para carga y descarga y forma de los pulsos

Tabla 1: Tiempos de carga banco condensadores

Voltaje (kV)	Capacitancia (uF)	Tiempo (ms)	Vpeak (V)
5	0,33	700	53,9
5	0,66	1600	52,3
5	1,00	3400	50,0
5	1,33	3800	49,9
10	0,33	1000	113,9
10	0,66	1800	110,6
10	1,00	2400	108,0
10	1,33	2600	104,9
15	0,33	1200	163,1
15	0,66	2000	159,4
15	1,00	2400	155,1
15	1,33	4000	151,2

Tabla 2: Tiempos de descarga hacia celda de tratamiento

Voltaje (kV)	Resistencia (kΩ)	Polaridad	Tiempo (ms)
5	10	n	26
5	10	p	28
5	55	n	32
5	55	p	33
5	100	n	26
5	100	p	34
10	10	n	18
10	10	p	28
10	55	n	41
10	55	p	44
10	100	n	45
10	100	p	49
15	10	n	28
15	10	p	32
15	55	n	54
15	55	p	60
15	100	n	66
15	100	p	82

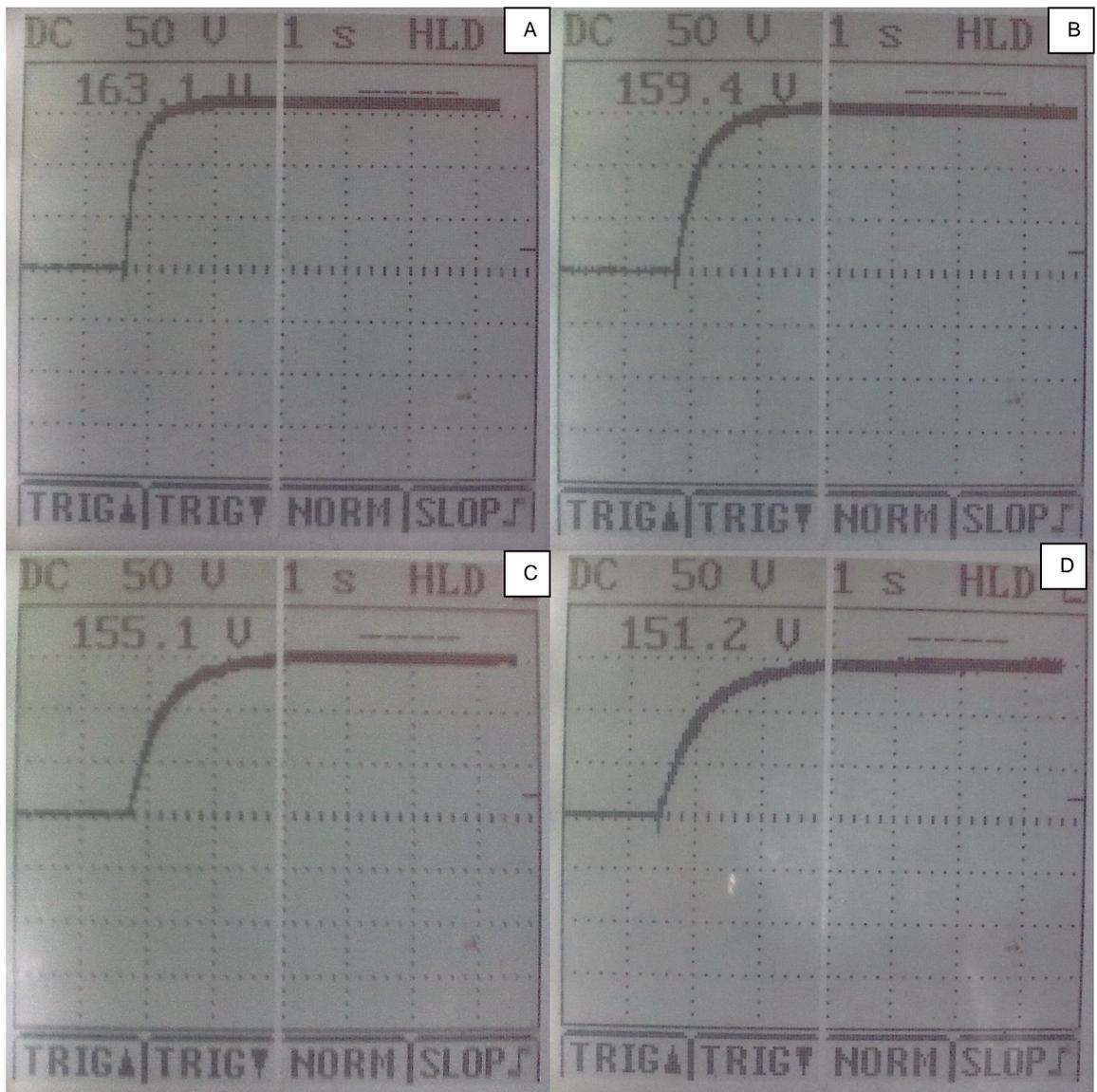


Figura 1: Carga de banco de condensadores a 15kV, tensión de alimentación 200VAC (V: 5000V/div t: 1s/div) a: 0,33uF, b: 0,66uF, c: 1,00uF, d:1,33uF

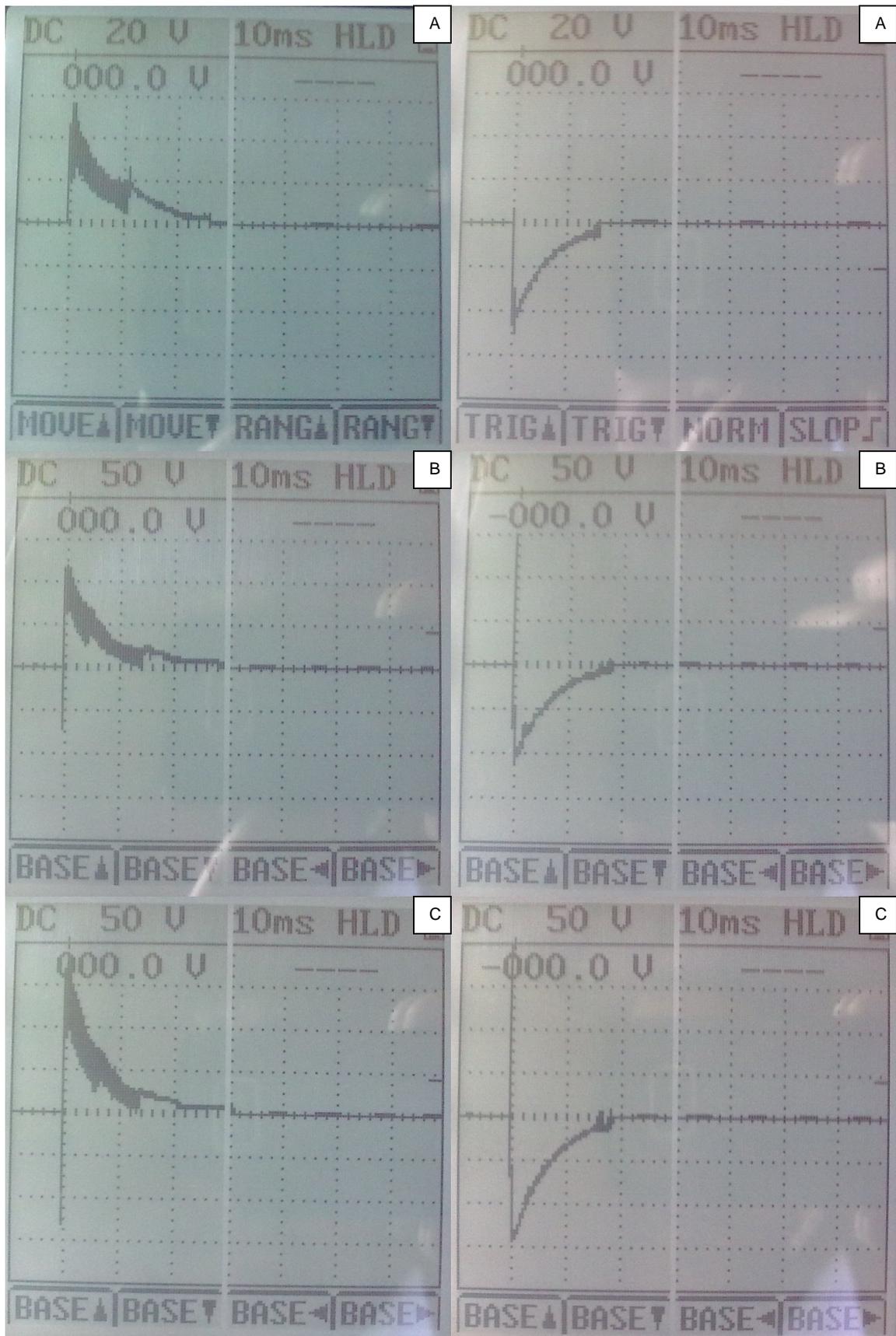


Figura 2: Descarga hacia celda de 10KΩ a 0,66μf bipolar, (V: 2000 y 5000V/div t: 10ms/div) a: 5kV, b: 10kV, c: 15kV