

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Desarrollo de un bioinsumo a partir de catalasa con potencial antioxidante para el mejoramiento de tratamientos orgánicos postcosecha de banano

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:
Ingeniero Químico

Presentado por:

José Elías Andrade Rivera

José Alberto Maridueña Bejarano

Dirigido por:

Dra. Patricia Manzano Santana, PhD.

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

A Dios, mi guía y fortaleza, le dedico este logro. Su amor incondicional ha sido mi luz, dándome la claridad y el propósito necesarios para alcanzar mis metas.

A mis padres, Luz Marina Bejarano y Milton Maridueña, les agradezco por inculcarme los valores que me definen. Su amor y sacrificio han sido la base de mi vida.

A mis hermanos, Víctor y Rafael, por ser mis compañeros de vida, compartiendo alegrías y desafíos.

A mi abuelita Cielo, que iluminó mi infancia con su amor y calidez, dejándome un legado de amor incondicional que siempre recordaré.

A mi gran amigo y compañero de tesis Elías Andrade por su dedicación y compromiso, y que este logro sea solo el comienzo de un camino lleno de éxitos compartidos, donde cada nuevo paso nos lleve a alcanzar juntos sueños aún más grandes.

- *José Alberto Maridueña Bejarano*

Dedicatoria

A mis padres agradeciendo a mi familia León, Andrade y Rivera. Mi madre, Elizabeth Rivera, mi padre Ricardo Andrade por su contribución, un apoyo incondicional, sacrificio y los valores que me han inculcado durante todos estos años.

A mis hermanos, José, Paulette y Mia, por estar conmigo en todo el camino, alegrar mi infancia y confié serán profesionales excepcionales.

Este trabajo refleja mi esfuerzo y dedicación, años de estudio y sacrificio, convirtiéndose en el primer paso de varias metas cumplidas.

A mi compañero de tesis José Maridueña por ser un compañero excepcional apoyando en todas las etapas del proyecto.

- *José Elías Andrade Rivera*

Agradecimientos

A la PhD. Patricia Manzano, nuestra tutora de tesis, cuya guía, paciencia y sabiduría han sido esenciales para la realización de este trabajo. Su apoyo constante ha sido una fuente de inspiración en todo momento.

A todo el equipo del CIBE, que nos abrió sus puertas y nos ofreció la oportunidad de integrarnos en un entorno de investigación de excelencia.

A los analistas de investigación del Laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos, MSc. Glenda Pilozo y MSc. Iván Chóez, por su dedicación y generosidad al compartir su vasto conocimiento, lo que ha sido clave para el éxito de este proyecto

José Elías Andrade Rivera

José Alberto Maridueña Bejarano

Nosotros José Elías Andrade Rivera y José Alberto Maridueña Bejarano acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autores/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 26 de mayo del 2024.



José Elías Andrade Rivera



José Alberto Maridueña Bejarano

Evaluadores

**M.Sc. María Verónica Ordoñez
Pazmiño**

Profesor de Materia

**Ph.D. Patricia Isabel Manzano
Santana**

Tutor de proyecto

Resumen

Este proyecto se enfoca en el desarrollo de un bioinsumo de catalasa elaborado a partir de sustratos agrícolas como lenteja amarilla y garbanzo tostado para evaluar el mejoramiento de la defensa de tratamientos orgánicos postcosecha de banano en contra de agentes oxidantes. En primera instancia se realizó la producción y caracterización del bioinsumo para la selección del sustrato óptimo entre diversos sustratos. Posteriormente, se realiza la evaluación de las propiedades antioxidantes de las mezclas globales; entre el bioinsumo a una concentración de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% y 35%; en combinación con un fungicida comercial (400 ppm); y peróxido de hidrógeno (4000 ppm). Además, se analizó la rentabilidad del proceso a escala piloto utilizando SuperPro Designer©. El bioinsumo agrícola elaborado con garbanzo tostado presentó mejor actividad enzimática del 1.09 ± 0.14 kU. A concentración del 10% de este bioinsumo demostró ser óptima para incrementar la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) de la mezcla (bioinsumo + fungicida), en un 47%; y, en presencia de peróxido de hidrógeno, en un 62%. Asimismo, esta dosificación incrementó el contenido de compuestos fenólicos en la mezcla (bioinsumo + fungicida) 8.4 veces, y 9.45 veces en presencia de peróxido de hidrógeno, de acuerdo con el análisis de TPC. Por último, se confirma la viabilidad de la producción enzimática del bioinsumo, a través del VAN de \$754.000, TIR de 30.95% y el PBP 2.03 años. Los resultados obtenidos son únicos y potencian de manera científica el uso del bioinsumo desarrollado en este estudio.

Palabras Clave: Bioinsumo, enzima, antioxidante, fermentación, fungicida

Abstract

This project focuses on the development of a catalase bioinput made from agricultural substrates such as yellow lentil and roasted chickpea to evaluate the improvement of the defense of organic post-harvest banana treatments against oxidizing agents. Firstly, the production and characterization of the bioinput was carried out to select the optimum substrate among various substrates. Subsequently, the antioxidant properties of the global mixtures were evaluated; between the bioinput at a concentration of 5%, 10%, 15%, 15%, 20%, 25%, 30% and 35%; plus, commercial fungicide (400 ppm); and hydrogen peroxide (4000 ppm). In addition, the cost-effectiveness of the process was analyzed on a pilot scale using SuperPro Designer©. The agricultural bioinput made from roasted chickpea showed better enzymatic activity of 1.09 ± 0.14 kU. A 10% concentration of this bioinput proved to be optimal for increasing the antioxidant capacity of the mixture, measured by DPPH and ABTS of the mixture (bioinput + fungicide), by 47%, and in the presence of hydrogen peroxide, by 62%. Also, this dosage increased the content of phenolic compounds in the mixture (bioinput + fungicide) 8.4-times, and 9.45-times in the presence of hydrogen peroxide, according to TPC analysis. Finally, the feasibility of enzymatic production of the bioinput is confirmed through the NPV of \$754,000, IRR of 30.95% and the PBP of 2.03 years.

Keywords: Bioinput, enzyme, antioxidant, fermentation, fungicide

Índice general

Resumen	7
Abstract	8
Índice general	9
Abreviaturas	12
Simbología.....	13
Índice de figuras	14
Índice de tablas	15
Capítulo 1.....	16
1.1 Introducción.....	17
1.2 Descripción del problema	18
1.3 Justificación del problema	19
1.4 Objetivos.....	20
1.1.1. Objetivo general	20
1.1.2. Objetivos específicos.....	20
1.5 Marco teórico.....	21
1.5.1 Producción de banano en Ecuador	21
1.5.2 Proceso postcosecha del banano en Ecuador	22
1.5.3 Desafíos en el almacenamiento postcosecha.....	24
1.5.4 Desafíos en la desinfección postcosecha.....	25
1.5.5 Biorecubrimientos en el proceso postcosecha de banano.	27
1.5.6 Producción enzimática de catalasa	27
1.5.7 Catalasa en la industria alimenticia.....	28
1.5.8 Antioxidantes presentes en banano	29

Capítulo 2.....	30
2.1 Diseño metodológico	31
2.2 Producción enzimática.....	32
2.2.1 Selección de sustratos	32
2.2.2 Recolección de bacteria	32
2.2.3 Preparación de medios de cultivo	33
2.2.4 Preparación de caldo bacteriano	33
2.2.5 Procedimiento McFarland.....	33
2.2.6 Fermentación de Estado Sólido.....	34
2.2.7 Extracción de enzima	35
2.3 Determinación de actividad catalasa	35
2.3.1 Preparación de muestras.....	35
2.3.2 Cristalización de FAS	35
2.3.3 Procedimiento espectrofotométrico	36
2.4 Análisis de mezclas del bioinsumo y fungicida.....	37
2.4.1 Selección de fungicida	38
2.4.2 Preparación de mezcla	38
2.5 Ensayos de actividad antioxidante.....	40
2.5.1 Determinación de actividad antioxidante mediante ABTS en microplaca	40
2.5.2 Determinación de actividad antioxidante mediante DPPH en microplaca	41
2.6 Determinación de fenoles totales.....	42
2.6.1 Contenido total de fenoles (TPC) en microplaca	42
2.7 Análisis estadístico de propiedades antioxidantes	42
2.8 Simulación de producción piloto de bioinsumo	43
2.8.1 Descripción del proceso de producción	43

2.8.2 Sección de fermentación	44
2.8.3 Operaciones utilizadas	45
2.8.4 Ingreso de componentes.....	47
2.8.5 Suposiciones.....	48
2.8.6 Validación de la simulación	49
2.8.7 Proyección tecno económica.....	49
Capítulo 3.....	50
3.1 Determinación de actividad enzimática.....	51
3.1.1 Análisis estadístico de la producción enzimática.....	53
3.2 Determinación de actividad antioxidante	54
3.2.1 Determinación de IC ₅₀ mediante técnica espectrofotométrica DPPH	54
3.2.2 Análisis antioxidante por técnica espectrofotométrica DPPH y ABTS	55
3.3 Cuantificación de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu.....	60
3.4 Validación de la simulación.....	64
3.5 Análisis de rentabilidad	66
Capítulo 4	69
4.1 Conclusiones y recomendaciones	70
4.1.1 Conclusiones	70
4.1.2 Recomendaciones.....	70

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
SGIA	Sistema de Gestión de Inocuidad de los Alimentos
PIB	Producto Interno Bruto
EROS	Especie Reactiva de Oxígeno
MDA	Malondialdehído
PDA	Agar Dextrosa y Papa
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
OH	Radical Hidroxilo
AG	Ácido Gálico
FAS	Ferrous Ammonium Sulfate – Sal de Mohr
SSA	Ácido Sulfosalicílico
ESPAC	Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua
ECD	Extracto estandarizado de semillas cítricas y glicerina
EC	Extracto de semillas cítricas a base de ácidos láctico y ascórbico
LSF	Fermentación de Estado Líquido
SSF	Fermentación de Estado Sólido
GRAS	Generalmente Reconocidos como Seguros
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
IC50	Concentración Inhibitoria Media
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
TPC	Contenido de Fenoles Total
VAN	Valor Actual Neto
TIR	Tasa Interna de Retorno
PBP	Periodo de Retorno

Simbología

mg	Miligramo
g	Gramos
kg	Kilogramo
MT	Tonelada Métrica
pH	Potencial de Hidrógeno
°C	Grados Celsius
K	Kelvin
J	Joules
μL	Microlitros
mL	Mililitro
L	Litro
μmol	Micromol
gmol	Gramo mol
mM	Milimolar
h	Horas
min	Minutos
ppm	Partes por millón
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
McF	Unidades del estándar McFarland
Ug ds ⁻¹	Unidad de actividad de catalasa por gramo de sustrato fermentado seco
kU	Katal Unit
rpm	Revoluciones por minuto
xg	Fuerza centrífuga relativa
%INH	Porcentaje de Inhibición

Índice de figuras

Figura 1.1 Diagrama del porcentaje de participación en la superficie cosechada por provincia ecuatoriana.....	21
Figura 1.2 Diagrama de bloques de la cadena de producción del banano.....	22
Figura 1.3 Diagrama de bloques del proceso postcosecha de banano	23
Figura 1.4 Eficacia de los desinfectantes EC y ECD en la reducción de unidades formadoras de colonias (UFC)	26
Figura 2.1 Esquema de la metodología del proyecto	31
Figura 2.2 Cultivos de Bacillus Subtilis MO	32
Figura 2.3 Fermentación de estado sólido de sustratos agrícolas para la producción enzimática	34
Figura 2.4 Cristalización de Sal de Mohr (FAS) en laboratorio	36
Figura 2.5 Determinación de actividad catalasa por espectrofotometría según el método Hadwan et al. (2024)	37
Figura 2.6 Diagrama de flujo de la simulación de producción enzimática del bioinsumo agrícola .	44
Figura 3.1 Actividad enzimática de las producciones de bioinsumo usando sustratos de lenteja y garbanzo	53
Figura 3.2 Diagrama de Cajas y Bigotes para la segunda producción de Muestra de Garbanzo.....	54
Figura 3.3 Efecto de la actividad antioxidante del fungicida añadiendo peróxido de hidrógeno y bioinsumo	57
Figura 3.4 Evaluación antioxidante de mezcla entre el bioinsumo y fungicida.....	58
Figura 3.5 Evaluación antioxidante de mezcla entre el bioinsumo y fungicida en presencia de peróxido de hidrógeno.....	58
Figura 3.6 Efecto de la cuantificación de fenoles del fungicida añadiendo peróxido de hidrógeno y bioinsumo	62
Figura 3.7 Evaluación de mezcla entre el bioinsumo y fungicida	63
Figura 3.8 Efecto de la cuantificación de fenoles del fungicida añadiendo peróxido de hidrógeno y bioinsumo	63

Índice de tablas

Tabla 1.1 Evaluación de la actividad antioxidante, concentración de antocianinas, fenoles totales y clorofila en fruto de fresas y en las hojas de cilantro post desinfección con ECD y EC	26
Tabla 2.1 <i>Esquema de trabajo para la formulación de mezclas para evaluación antioxidante</i>	39
Tabla 2.2 <i>Formulación de mezclas para evaluación antioxidante en presencia de peróxido de hidrógeno</i>	39
Tabla 2.3 <i>Especificaciones de las operaciones unitarias en el proceso de producción del bioinsumo</i>	45
Tabla 2.4 <i>Parámetros requeridos para el registro de nuevos componentes en SuperPro Designer.</i>	47
Tabla 2.5 <i>Suposiciones del proceso de producción del bioinsumo enzimático</i>	48
Tabla 3.1 <i>Actividad enzimática de las producciones de bioinsumo usando sustratos de lenteja y garbanzo</i>	51
Tabla 3.2 <i>Tabla del IC50 del Fungicida comercial evaluando la actividad antioxidante según la técnica DPPH</i>	55
Tabla 3.3 <i>Actividad antioxidante del fungicida por técnica DPPH</i>	59
Tabla 3.4 <i>Actividad antioxidante del fungicida por técnica ABTS</i>	59
Tabla 3.5 <i>Cuantificación de fenoles del fungicida</i>	63
Tabla 3.6 <i>Comparación de datos de simulación</i>	66
Tabla 3.7 <i>Flujo efectivo</i>	67
Tabla 3.8 <i>Criterios de rentabilidad de la planta de producción enzimática</i>	68

Capítulo 1

1.1 Introducción

Según el *Ministerio del Comercio Exterior* (2017), Ecuador es uno de los mayores productores de banano a nivel mundial, en donde el cultivo de esta fruta cubre un porcentaje destacado del 35 % del PIB agrícola y el 2 % del PIB nacional. Este sector productivo beneficia aproximadamente el 6% de la población total del país a través de la generación de empleo para las familias ecuatorianas.

En el 2023, la industria del banano evidenció un crecimiento del 10% en las importaciones hacia EE. UU. (*Proecuador*, 2020). Este crecimiento evidencia la importancia de la disminución de las pérdidas postcosecha. Ante este desafío, se plantea la intensificación de la producción mediante la implementación de sistemas agrícolas sostenibles como una estrategia para fomentar el desarrollo económico y social en Ecuador.

Según Mansoor et al., (2022) el uso de especies reactivas de oxígeno (EROS) como el peróxido de hidrógeno utilizado en los lavados postcosecha afectan la capacidad antioxidante de la fruta, mediante muerte celular por oxidación y degradación de su tratamiento orgánico. Lo cual conduce a pérdidas postcosecha en el sector agrícola.

Por lo tanto, el presente estudio se centra en el mejoramiento de tratamientos orgánicos postcosecha de banano mediante la incorporación de catalasa como agente antioxidante. Esta enzima posee la función de destruir al peróxido de hidrógeno dando lugar al oxígeno molecular y agua, evitando que este sanitizante comprometa el tratamiento orgánico y cause estrés oxidativo en la fruta. (Zarbakhsh et al., 2024).

1.2 Descripción del problema

La producción de banano en Ecuador mantiene una presencia mundial en constante desarrollo, considerado el producto agrícola con mayor aporte económico para el país seguido del café y cacao (*Ministerio del Comercio Exterior, 2017*). Pese a esto, el sector cuenta con pérdidas sustanciales del producto, en un rango del 10 % al 80 % las cuales son causadas por daños mecánicos, plagas, maduración prematura, deformidades, manipuleo, entre otros (*FAO, 2005*).

Según investigación realizada por la Facultad de Agricultura de la Universidad Del Cairo (Shehata et al., 2021), se demostró que los tratamientos orgánicos que incluyen al quitosano, proporcionan beneficios a la producción de banano a mencionar: mejora en la calidad, tiempo de almacenamiento y conservación de las propiedades vitamínicas y antioxidantes de frutos y vegetales.

El peróxido de hidrógeno es un insumo agrícola utilizado para la desinfección, reconocido por ser un agente sanitizante seguro y rentable. Su acción como biocida es efectiva en la etapa de desinfección, donde se emplea para reducir la carga microbiana en el banano (de Siqueira Oliveira et al., 2018).

Sin embargo, el quitosano presenta limitaciones en peróxido de hidrógeno. La potente capacidad oxidante de este último degrada la estructura del quitosano, fragmentándolo en oligosacáridos (Mahmud et al., 2014). Esta degradación no solo disminuye la eficacia antimicrobiana y antioxidante del quitosano, sino que también interfiere en su capacidad para formar una barrera protectora alrededor del fruto. Como resultado, la descomposición del banano se acelera y su calidad se compromete durante el almacenamiento. Para mitigar este conflicto, se pueden emplear bioinsumo orgánicos con propiedades antioxidantes naturales que mantengan la eficacia antimicrobiana, asegurando así una conservación.

1.3 Justificación del problema

Ecuador es el mayor exportador de banano del mundo, más de 317 millones de cajas por año, generando alrededor de 2.5 millones de empleos de manera directa e indirecta (Vásquez-Castillo et al, 2019). El banano junto con demás productos de exportación como cacao y camarón representan en total un PIB de 100,000 millones de dólares, aproximadamente (León Serrano et al., 2020), permaneciendo en la actualidad como una industria en desarrollo constante.

En respuesta al incremento de esta productividad dentro del sector bananero, existe la necesidad de proteger al banano durante la etapa postcosecha. Biorecubrimientos o tratamientos agrícolas, como el quitosano, han demostrado control efectivo ante numerosas enfermedades pre y postcosecha en diversos productos hortícolas. Por ejemplo, tanto patógenos del suelo como plantas foliares (fúngicos, bacterianos y virales) pueden controlarse mediante la aplicación de quitosano (Bautista-Baños et al., 2006).

Dentro del proceso de producción bananera el peróxido de hidrógeno se ha utilizado ampliamente en la industria alimentaria, debido a su fuerte propiedad oxidante y su capacidad para causar daño oxidativo celular en células microbianas, aumentando de esta forma la defensa de productos orgánicos contra patógenos alimentarios bacterianos, fúngicos y virales, incluida la habilidad de descontaminar superficies de SARS-CoV-2 (Abdelshafy et al., 2024).

El desarrollo de soluciones para la aplicación de ambos procesos en la industria sin la degradación de tratamientos orgánicos como el quitosano en presencia de peróxido de hidrógeno (Mahmud et al., 2014) impulsa la implementación de catalasa durante el proceso postcosecha. La catalasa tiene propiedades antioxidantes que protege biomoléculas contra el daño oxidativo descomponiendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno (Piotrowska-Długosz, 2019).

1.4 Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Producir un bioinsumo enzimático basado en catalasa para mejorar el tratamiento postcosecha del banano mediante la evaluación de su potencial antioxidante

1.1.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar un bioinsumo a partir de catalasa de diversos sustratos agrícolas y caracterizar su potencial enzimático mediante técnicas espectrofotométricas.
2. Evaluar la actividad antioxidante de la mezcla óptima de un bioinsumo a partir de catalasa y un fungicida, obtenida mediante un diseño estadístico de mezcla de dos componentes.
3. Simular el proceso a escala piloto de la producción de un bioinsumo enzimático para el tratamiento bananero postcosecha y realizar el análisis económico.

1.5 Marco teórico

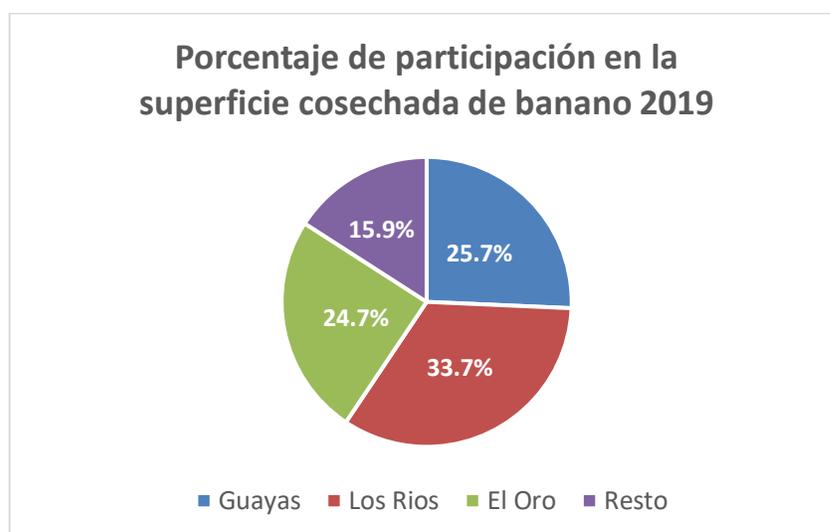
1.5.1 Producción de banano en Ecuador

Ecuador es un principal exponente en la producción y exportación mundial de banano. Según datos de la Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador para el período de enero a noviembre de 2022, el país exportó 234.42 millones de cajas de banano hacia países de la Unión Europea, lo que representó el 26.67% de las exportaciones globales, consolidándose como el principal destino de exportación.

Las principales provincias ecuatorianas productoras de banano, como son: Guayas, El Oro y Los Ríos. Siendo la provincia de El Oro, donde se ubican una cantidad significativa de pequeños productores bananeros (42%), mientras que los grandes empresarios del sector, se ubican mayoritariamente en las provincias del Guayas y Los Ríos (Ajila et al., 2023) acumulando una producción total entre las tres provincias del 84,1% de toda la superficie cosechada de éste producto (ESPAC, 2019). En la Figura 1.1, se logra visualizar la distribución porcentual de la superficie cosechada en el Ecuador durante el año 2019.

Figura 1.1

Diagrama del porcentaje de participación en la superficie cosechada por provincia ecuatoriana



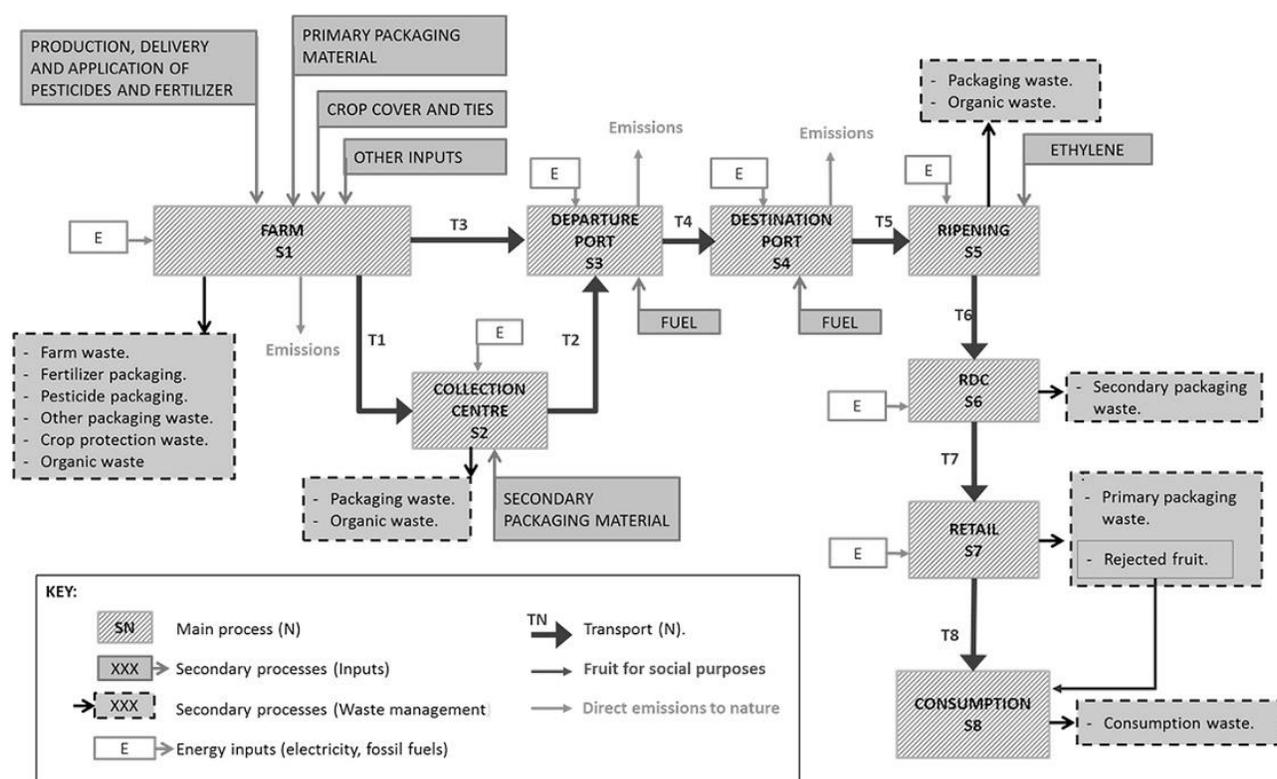
Nota. Información adaptada de (ESPAC, 2019)

1.5.2 Proceso postcosecha del banano en Ecuador

Según la investigación realizada por Roibás et al., (2016), tomado en cuenta datos de las tres provincias de mayor producción bananera Guayas, Los Ríos y El Oro, asegurando la toma de datos representativos, en concordancia con la Figura 1.2 realiza la esquematización del proceso de producción desde la cosecha de cultivo en el Ecuador hasta su consumo en el mercado de exportación. El alcance del proyecto se centra en el mejoramiento del tratamiento postcosecha.

Figura 1.2

Diagrama de bloques de la cadena de producción del banano



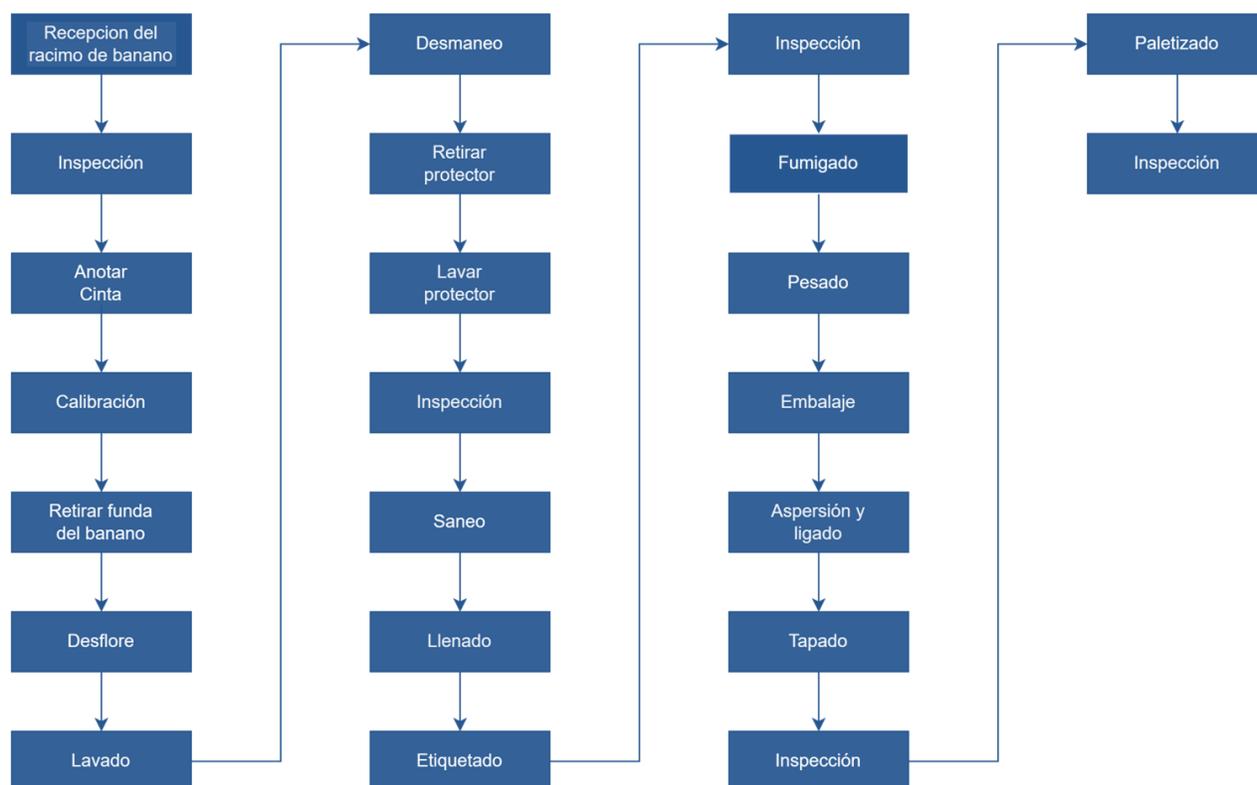
Nota. Tomado de (Roibás et al., 2016)

La reducción de pérdida postcosecha de productos agrícolas, es un desafío para la industria de países en desarrollo debido a diferencias de infraestructura y avance tecnológico. En la investigación de Péra et al., (2023), definió las etapas de cultivo, cosecha, almacenamiento, transporte y distribución final de los productos agrícolas como etapas de mayor fuente de pérdidas

De acuerdo con lo reportado por Panchez et al., (2021), sobre la inspección de banano, este llega al área de llenado, el cual se desarrolla en bandejas de plástico donde se pesan las manos de banano que varían según el tipo de caja que se vaya a utilizar y su lugar de destino. A continuación, se etiqueta cada dedo del banano con una etiqueta de la marca de la caja. Hasta la etapa de interés del proyecto, la corona del banano se fumiga para evitar pudrición o maduración temprana (Figura 1.3).

Figura 1.3

Diagrama de bloques del proceso postcosecha de banano



Nota. Información adaptada de (Panchez et al., 2021)

1.5.3 Desafíos en el almacenamiento postcosecha

El proceso de almacenamiento a bajas temperaturas es una de las estrategias más efectivas para prolongar el tiempo de vida y la calidad del fruto (Fang & Wakisaka, 2021). Sin embargo, uno de los mayores desafíos es el daño por congelamiento, los síntomas incluyen decoloración subepidérmica, aparición de manchas marrones en la cáscara, pérdida del aroma original y sabor, inhibición de la conversión de almidón-azúcar, reducción en la formación de aroma y finalmente produce descomposición microbiana disminuyendo la calidad del producto (Wang et al., 2021).

El daño por congelamiento es causado debido al aumento de la producción de EROS por las bajas temperaturas durante el almacenamiento (Sugianti et al., 2022) desequilibrando la capacidad de las células para desintoxicarse (Hong et al., 2024). Las especies reactivas de oxígeno (EROS) participan en el estrés oxidativo de plantas, degradando la estructura de membranas, conforme a la capacidad de oxidar biomoléculas como proteínas y lípidos (Sugianti et al., 2022).

El daño por congelamiento desencadena estrés oxidativo, debido al aumento de la producción de EROS desequilibrando la capacidad de las células para desintoxicarlas. Este desempeña un papel importante en la alteración de la función celular normal y puede provocar inflamación, lesión de tejidos y disfunción de órganos (Hong et al., 2024).

En este contexto, la pérdida de electrolitos y aumento de malondialdehído (MDA) puede ser un indicador cuantitativo del daño por congelamiento en banano. Siendo el MDA uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Chen et al., 2021). Relacionando el estrés oxidativo con el daño por congelamiento.

1.5.4 Desafíos en la desinfección postcosecha

El uso de EROS como el peróxido de hidrógeno se ha evaluado en la etapa de desinfección de plántulas de maíz, favoreciendo el desarrollo a bajas concentraciones (Santillán et al., 2023) ha sido evaluado en banano inhibiendo la germinación de esporas de las principales especies fúngicas componentes del “Crown Rot” del plátano. Debido a esto se considera una opción válida para el tratamiento del agua que se reutiliza para el lavado de la fruta (Perera et al., 2012).

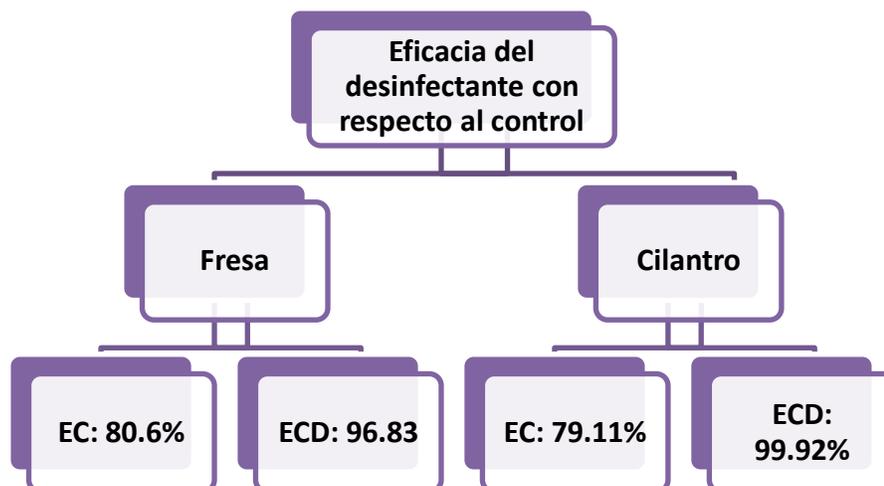
En la investigación de Salgado-Escobar et al., (2020), evaluó el efecto de desinfectantes comerciales obtenidos de extractos cítricos en fresas y cilantro. Estos desinfectantes se aplicaron de dos maneras: después de un lavado con detergente ECD (extracto estandarizado de semillas cítricas y glicerina), y de forma directa con EC (extracto de semillas cítricas a base de ácidos láctico y ascórbico).

En el Figura 1.4 se presentan los resultados de los diferentes tratamientos de desinfección. Se puede observar que el tratamiento con ECD fue significativamente más efectivo ($p < 0.05$) en fresas y cilantro, logrando una reducción del 97% y 99.9% de las unidades formadoras de colonias, respectivamente.

Los resultados, detallados en la Tabla 1.1, revelaron una reducción en las propiedades nutraceuticas de las fresas y el cilantro, particularmente en su capacidad antioxidante total y la cantidad de fenoles, en presencia de peróxido de hidrógeno medida mediante el ensayo FRAP y TPC. Este ensayo sugiere que los tratamientos orgánicos a base de extractos cítricos tienden a disminuir la capacidad antioxidante del fruto.

Figura 1.4

Eficacia de los desinfectantes EC y ECD en la reducción de unidades formadoras de colonias (UFC)



Nota. Información adaptada de (Salgado-Escobar et al., 2020), ECD (extracto estandarizado de semillas cítricas y glicerina), EC (extracto de semillas cítricas a base de ácidos láctico y ascórbico)

Tabla 1.1

Evaluación de la actividad antioxidante, concentración de antocianinas, fenoles totales y clorofila en fruto de fresas y en las hojas de cilantro post desinfección con ECD y EC

Tratamiento	Fresas			Cilantro		
	Fenoles (mg EAG g ⁻¹)	FRAP (μmol Trolox g ⁻¹)	Antocianinas (mg Cyd-3-glu g ⁻¹)	Fenoles (mg EAG g ⁻¹)	FRAP (μmol Trolox g ⁻¹)	Clorofila total (mg 100 g ⁻¹)
Control -	0.92 a	5.17a	0.11a	0.84 a	4.2a	50.1 ab
EC	0.63 a	3.35 b	0.1 ab	0.87 a	3.86 ab	38.27 b
ECD	0.75 a	4.05 ab	0.059b	0.69 a	2.96 b	50.79 ab

Nota. Información adaptada de (Salgado-Escobar et al., 2020)

1.5.5 Biorecubrimientos en el proceso postcosecha de banano

Los biorecubrimientos son un enfoque innovador y respetuoso con el medio ambiente para preservar la frescura de frutas y verduras (Ungureanu et al., 2023). Los biorecubrimientos comestibles mantienen la calidad durante el proceso de almacenamiento debido a su capacidad para mantener el color, los ácidos orgánicos, el azúcar y los componentes del sabor durante el almacenamiento, retardando el proceso de maduración del banano (Thakur et al., 2019)

Biorecubrimientos con quitosano en banano “Cavendish” han sido evaluados debido a sus beneficios como retardante de maduración en el fruto, manteniendo su calidad y controlando la degradación del fruto, prolongando su tiempo de vida, reduciendo la pérdida de peso y retardando la pérdida de vitamina C (Suseno et al., 2014).

La eficacia de biorecubrimientos suele verse comprometida por factores como la formulación, circunstancias de almacenamiento, características del fruto, tipo de producto y condiciones superficiales del recubrimiento (Moncayo et al., 2013).

1.5.6 Producción enzimática de catalasa

Existen dos métodos más comunes para la producción enzimática *in situ* a mencionar:

A.- Método convencional es la fermentación de estado líquido (LSF) donde se utilizan de nutrientes (fuentes de carbono) provenientes de subproductos de industrias alimenticias, estos proveen de alimento para el cultivo de microorganismos productores de enzimas. Este método permite la producción masiva de enzimas en una calidad uniforme.

B.- Método fermentación en estado sólido (SSF), desarrollado por Shinkawa & Mitsuzawa, (2020), emplea la biomasa en la línea de proceso principal utilizándola como nutriente para los microorganismos productores de enzimas (Shinkawa & Mitsuzawa, 2020).

El método SSF conlleva ventajas sobre la LSF, la primera es la eliminación de nutrientes y

la segunda es la disminución en el gasto de agua, lo que resulta una reducción de tamaño de los tanques de fermentación (Shinkawa & Mitsuzawa, 2020). La técnica de SSF se utiliza para la producción de enzima catalasa a escala comercial usando bacteria *Aspersgillus niger* (Razaq, 2020).

Las enzimas catalasas son de diferentes tipos, la fermentación empleada por Aruldoss et al. utilizó *Bacillus subtilis* obtenido de muestras de tierra, utilizando SSF en sustratos agroindustriales como lenteja amarilla, garbanzo tostado, salvado de arroz y harina (Aruldoss & Kalaichelvan, 2014) El *Bacillus subtilis* junto con el *Aspergillus Oryzae* son incluidos en la lista de organismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU reconociéndolo por su extenso uso en la industria alimenticia (FDA, 2023).

1.5.7 Catalasa en la industria alimenticia

La catalasa (CAT) es una enzima presente en todos los organismos aerobios fundamental en la protección antioxidante contra el daño oxidativo (Patel & Vora, 2022), se encuentra en diferentes tipos y es empleada en una amplia gama de industrias, más comúnmente utilizada en la industria alimenticia, y su producción comercial emplea técnicas de fermentación en estado sólido mediante *Aspersgillusnigeris* siendo la más común glucosa oxidasa para la preservación de alimentos (Razaq, 2020).

La catalasa se ha utilizado como un preservante orgánico para mejorar el tiempo de vida y mantener el color y aroma de productos orgánicos como jugo de uva (Castellari et al., 2000); además, esta molécula se ha implementado para mantener el valor nutricional de alimentos frescos empleándola en contra de oxidasas lo cual reduce la formación de radicales libres, protegiendo el alimento de descomposición (Razaq, 2020).

La implementación de peróxido de hidrógeno como agente antimicrobiano ha aumentado mundialmente, utilizado extensivamente en la industria alimenticia (Abdelshafy et al., 2024). Sin

embargo, la remoción del agente antimicrobiano previo al comercio alimenticio es importante. Un método de producción fue desarrollado para la remoción de peróxido de hidrógeno de bebidas usando catalasa atrapada en envases de alginato (Razaq, 2020).

1.5.8 Antioxidantes presentes en banano

Debido a su naturaleza tropical, el banano desarrolla mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo inducido por la intensa radiación solar y las altas temperaturas, generando una abundante cantidad de antioxidantes (Zou et al., 2022).

Los compuestos antioxidantes presentes en los bananos incluyen compuestos fenólicos como flavonoides, taninos, vitamina C, vitamina E, β -caroteno, entre otros (Baskar et al., 2011). La mayor parte de los compuestos fenólicos tienen una función estructural y son responsables, en cierta medida, del color, sabor y aroma de ciertas especies de plantas y frutos. Asimismo, funcionan como un mecanismo de autodefensa ante patógenos o protección contra la radiación/oxidación (Avram et al., 2022)

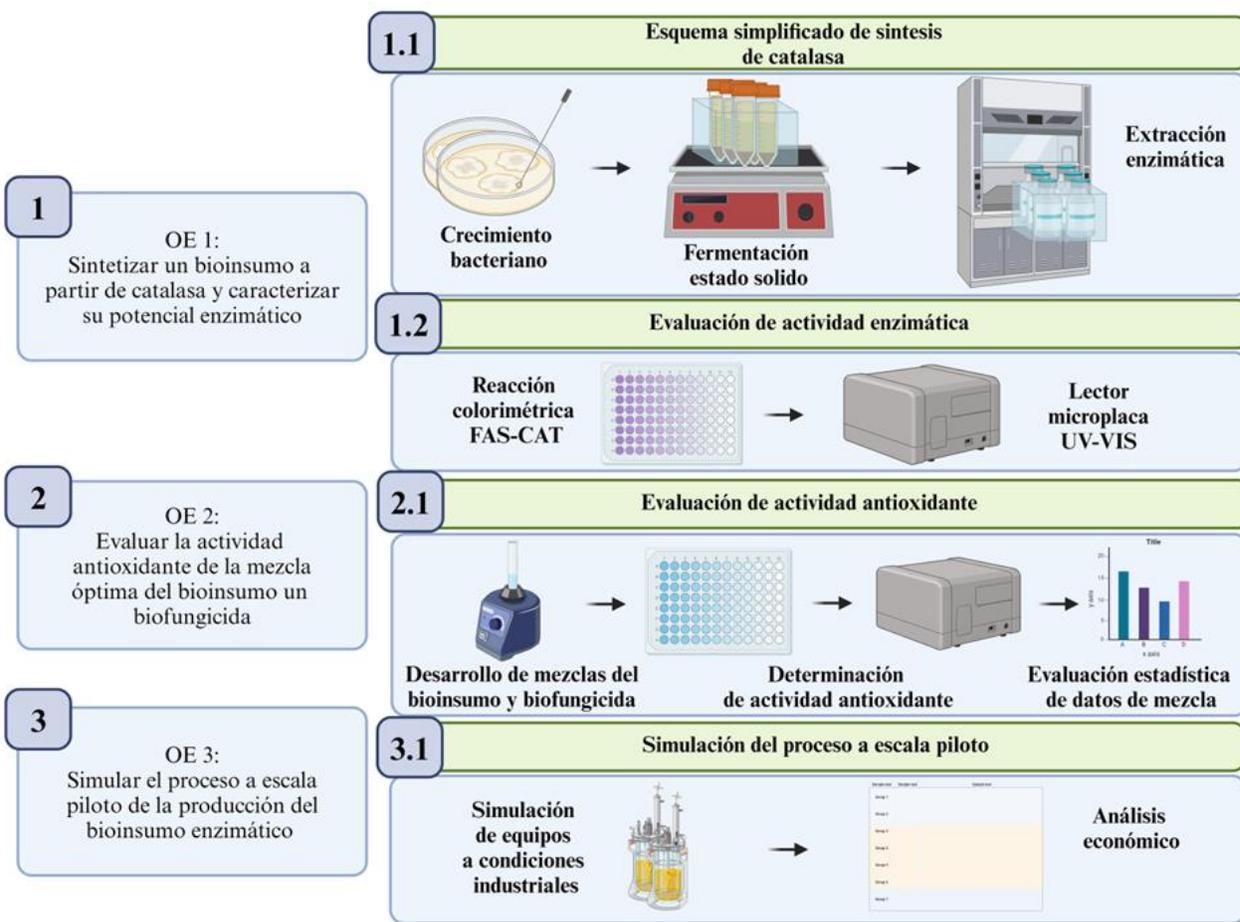
Capítulo 2

2.1 Diseño metodológico

En la figura 2.1 se muestran las fases del proceso del desarrollo del bioinsumo enzimático, mediante la determinación de actividades clave para alcanzar nuestros objetivos establecidos. Las etapas comienzan desde la producción de la enzima, hasta su aplicación usando una simulación del proceso de tratamiento postcosecha de banano en SuperPro Designer. Proporcionando una validación de los beneficios antioxidantes en tratamientos fungicidas empleados en banano e implementación en la industria bananera.

Figura 2.1

Esquema de la metodología del proyecto



2.2 Producción enzimática

2.2.1 Selección de sustratos

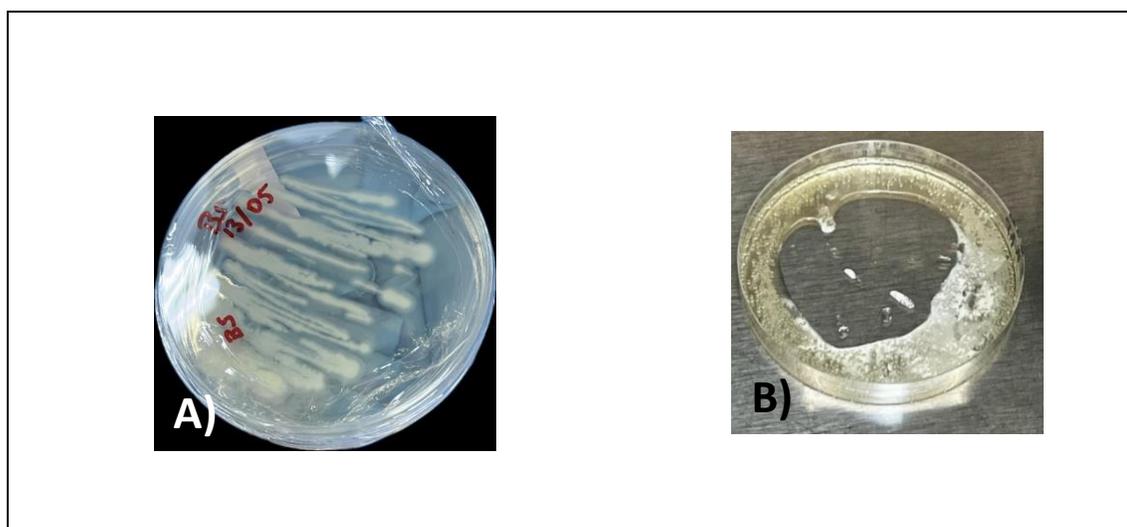
Se utilizaron los dos sustratos mencionados por el artículo base con mayor potencial enzimático, lenteja amarilla y garbanzo tostado con una actividad catalasa de 9.13 y 8.12 $Ug\ ds^{-1}$ para realizar la producción de catalasa mediante fermentación de estado sólido usando *Bacillus subtilis* MO. Posterior a selección se realiza un lavado del sustrato para eliminar impurezas presentes previas al proceso y realizar una molienda del sustrato agrícola (Aruldoss & Kalaichelvan, 2014).

2.2.2 Recolección de bacteria

Se aislaron colonias de *Bacillus subtilis* M.O., productoras de catalasa, y se seleccionaron aquellas con actividad catalasa comprobada mediante pruebas rápidas. Las colonias seleccionadas se cultivaron en 15 mL de medio nutritivo PDA (Agar Dextrosa y Papa) en placas Petri, como se ilustra en la Figura 2.2 (Aruldoss & Kalaichelvan, 2014).

Figura 2.2

Cultivos de Bacillus Subtilis MO



Nota: A) Cultivo de *Bacillus subtilis* MO. B) Prueba rápida de *Bacillus subtilis* MO.

2.2.3 Preparación de medios de cultivo

Se prepara medio mínimo M9, primero se realiza una alícuota de sales se utilizaron los reactivos 2.5 g cloruro de sodio, 15 g fosfato dihidrógeno de potasio, 5 g cloruro de amonio y 64 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado, se disuelve en un litro de agua destilada y esteriliza por autoclave por 1 hora y 30 min.

Se miden 700 ml de agua destilada estéril y se agregan 200 ml de la alícuota de sales preparada, se añaden 2 ml de sulfato de magnesio 1 molar, 20 ml de glucosa al 20% y 100 microlitros de cloruro de calcio 1 molar, finalmente aforar a 1 litro la solución final (Novopro, 2024).

2.2.4 Preparación de caldo bacteriano

Se prepara un caldo bacteriano utilizando 8 g de peptona, 2 g de cloruro de sodio y 4 g de extracto de levadura, finalmente se afora con 50 ml de agua destilada y se verifica el pH de la solución a un valor de 7.2 (Aruldoss & Kalaichelvan, 2014).

2.2.5 Procedimiento McFarland

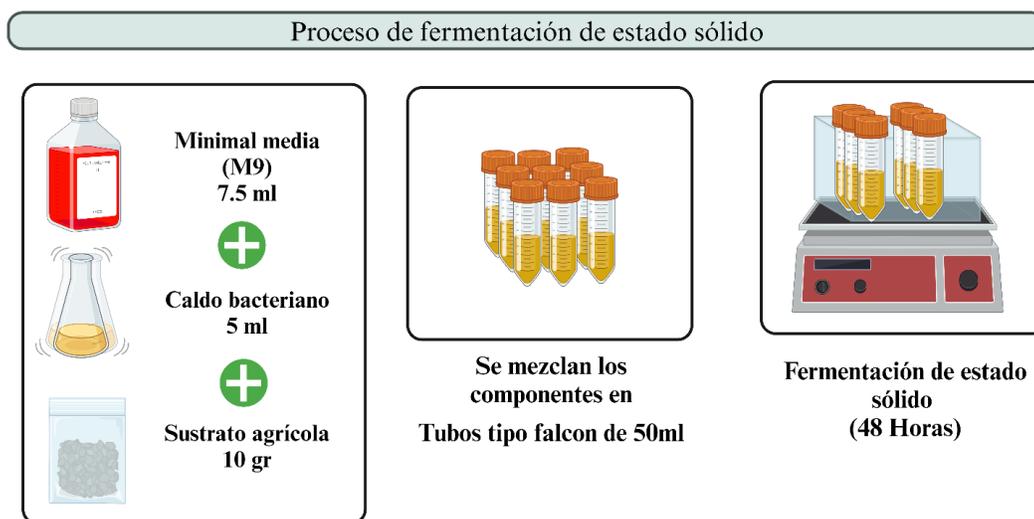
Se realiza un estándar McFarland de bacteria *Bacillus Subtilis* MO en solución salina al 5%. Se traslada colonias desde una caja Petri a un tubo de ensayo de base plana, mediante un raspado con asa bacteriológica se trasladan inóculos de la bacteria al tubo de ensayo, posteriormente se agita mediante vortex homogenizando el tubo para la lectura, luego se mide mediante un Densitómetro McFarland a un valor de 1 unidad McFarland, (10^8 UFC) para finalmente inocular el caldo bacteriano usando el estándar a una proporción de 20ml por litro. El caldo bacteriano se deja en incubación con agitación a 30 °C, 150 rpm por 15 horas (Corral-Lugo et al., 2012).

2.2.6 Fermentación de Estado Sólido

La Figura 2.3 ilustra el proceso de fermentación en estado sólido según el procedimiento descrito por Aruldoss et al, (2014) en el cual el medio de cultivo estéril se inocula añadiendo 5 ml del caldo bacteriano a tubos de ensayo cónicos de 50 ml tipo Falcon conteniendo el medio. Posteriormente, se realiza un mezclado y homogenización para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos. Los tubos tipo Falcon con el medio inoculado se incuban a 30°C en una incubadora con agitación durante 48 horas, lo que favorece el crecimiento y las actividades metabólicas de los organismos. Tras 48 de incubación, se extraen las muestras del medio fermentado, se transfieren y se homogeneizan utilizando un agitador de vidrio (Aruldoss & Kalaichelvan, 2014).

Figura 2.3

Fermentación de estado sólido de sustratos agrícolas para la producción enzimática



2.2.7 Extracción de enzima

Para la extracción de la enzima, el sustrato fermentado se mezcla cuidadosamente con 100 ml de buffer de fosfato salino, ajustado a un pH de 7. Esta mezcla se agita en un agitador rotatorio a 180 rpm y se mantiene a una temperatura constante de 30 grados Celsius durante un periodo de 2 horas, lo que facilita la liberación de la enzima. Tras la agitación, la mezcla se filtra utilizando un paño de muselina para eliminar los residuos sólidos. El filtrado se somete a centrifugación a 10,000xg durante 15 minutos a 4 grados Celsius, asegurando la separación eficiente de los componentes. El sobrenadante obtenido se envasa en frascos ámbar de 50ml para realizar pruebas posteriores de actividad de catalasa (Aruldoss & Kalaichelvan, 2014).

2.3 Determinación de actividad catalasa

2.3.1 Preparación de muestras

Se extraen 2 ml y se dispensan en tubos tipo Eppendorf para su homogeneización mediante vortex. Después, estas muestras se someten a centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos, asegurando la fiabilidad del análisis espectrofotométrico.

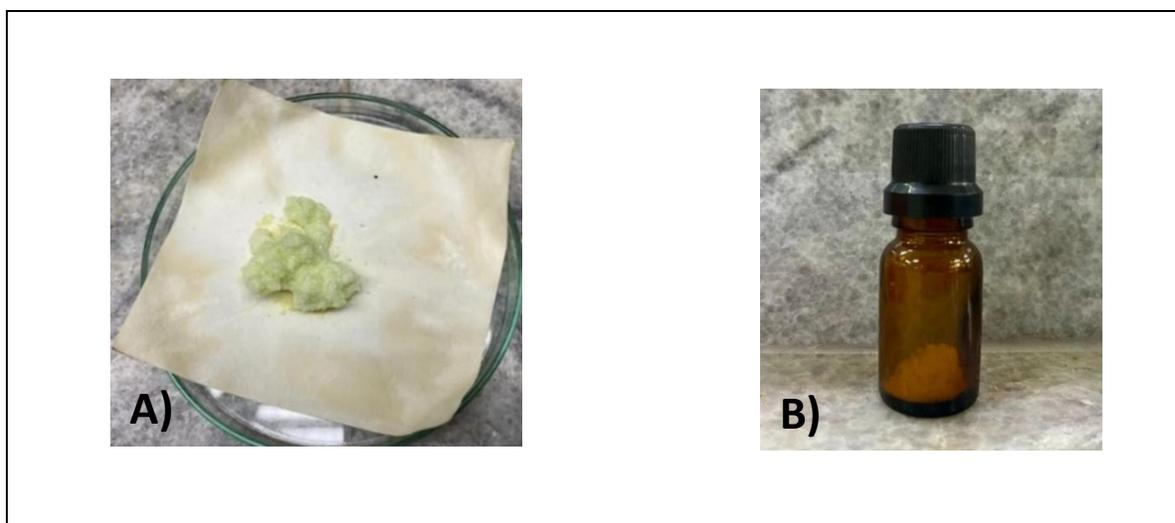
2.3.2 Cristalización de Sal de Mohr (FAS)

Se prepara una solución acuosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0.4 g/ml y una solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a una concentración de 0.2 g/ml. Se calienta la solución de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a baño maría a 60 grados Celsius por 10 minutos. Se retira del baño maría la solución aún caliente y se mezclan ambas soluciones y se regula a un pH ligeramente ácido usando H_2SO_4 a una concentración 2 molar, usando aproximadamente de 1-2 ml. El líquido se mantiene en el cristalizador de 3-4 días hasta la obtención de cristales color verde. Finalmente se separan usando filtrado al vacío y se realiza un lavado con agua destilada. La Figura 2.4 muestra los cristales obtenidos después del

secado (A) y su almacenamiento en un frasco de vidrio ámbar (B) (CBSE Chemistry Practicals Class 12, n.d.)

Figura 2.4

Cristalización de Sal de Mohr (FAS) en laboratorio



Nota: A) Cristal post-secado B) Almacenamiento del reactivo

2.3.3 Procedimiento espectrofotométrico

Se utilizó el procedimiento de microplaca de Hadwan et al, se preparó una placa de 96 pocillos con 100 μ l de peróxido 5 mM mezclado con 20 μ l de muestra enzimática CAT. Al colocar el peróxido de hidrógeno se incubó la placa a 37°C durante 5 min. Después de esto, se agregaron 130 μ l de reactivo SSA-CAT de trabajo a cada pocillo. Luego la placa se incubó durante 5 minutos más a 25°C. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm, tal como se detalla en la Figura 2.5.

En un pocillo en blanco, se utilizó agua destilada en lugar de enzima CAT y H₂O₂. En un pozo estándar, se usó agua destilada en lugar de enzima CAT. En un pozo de control, se usó Agua destilada en lugar de una solución de H₂O₂. La actividad se calcula mediante la ecuación proporcionada.

$$\text{Actividad Enzimática de Catalasa (kU)} = \frac{2.303}{t} * \log \left[\frac{S^\circ}{S - M} \right] * \frac{V_t}{V_s}$$

t: Tiempo

S°: Absorbancia del tubo estándar

S: Absorbancia del tubo de ensayo

M: Prueba de absorbancia del control (factor de corrección)

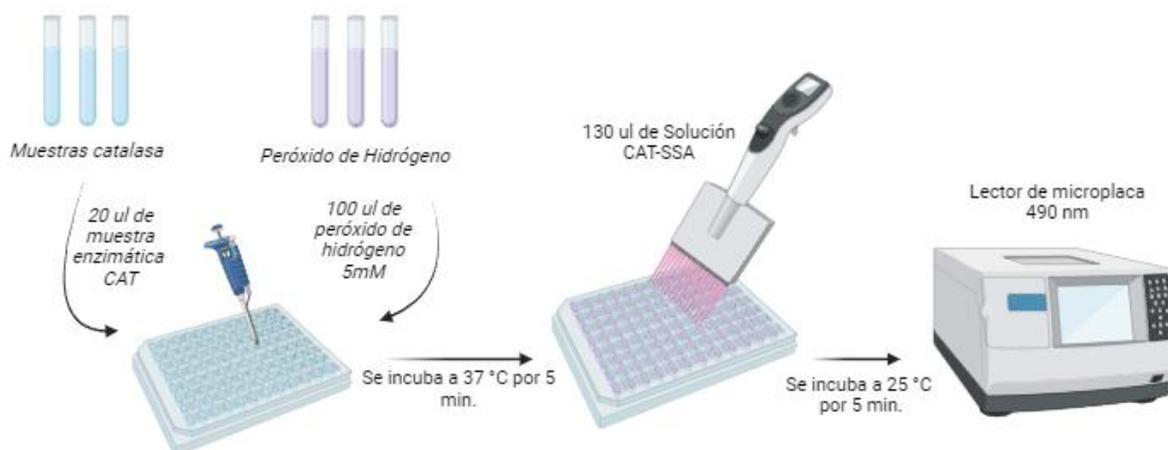
Vt: Volumen total (ml) del tubo de ensayo

Vs: Volumen de muestra (ml)

Durante el procedimiento es necesario eliminar las interferencias que surgen de la presencia de azúcares, aminoácidos, proteínas y vitaminas en la muestra. Aplicamos un factor de corrección conocido como prueba de control para hacer esto (Hadwan et al., 2024).

Figura 2.5

Determinación de actividad catalasa por espectrofotometría según el método Hadwan et al. (2024)



2.4 Análisis de mezclas del bioinsumo y fungicida

El propósito del ensayo consiste en demostrar que la combinación del bioinsumo, que contiene catalasa, con fungicida puede aumentar el potencial antioxidante del producto, protegiéndolo del efecto dañino del peróxido de hidrógeno y preservando su calidad postcosecha.

2.4.1 Selección de fungicida

Se evaluará la integración del bioinsumo enzimático con un fungicida comercial de baja toxicidad a base de extractos de cítricos, conocido por sus propiedades bactericidas y fungicidas naturales (CHEMIE, 2024). Los extractos cítricos contienen compuestos bioactivos como flavonoides y limonoides, los cuales han demostrado efectividad antimicrobiana contra una variedad de patógenos (Książek, 2024). Esta sinergia es ideal para tratamientos orgánicos, ya que el fungicida natural, junto con la acción antioxidante del bioinsumo enzimático basado en catalasa, puede mejorar la protección del producto postcosecha sin comprometer la seguridad del consumidor ni la calidad del producto.

2.4.2 Preparación de mezcla

La Tabla 2.1 detalla la preparación de mezclas entre el fungicida comercial y el bioinsumo enzimático, en el cual se establece un esquema de formulación que contienen variaciones en el porcentaje de bioinsumo de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, y 35%, sin la adición de peróxido de hidrógeno.

Mientras que a partir de la evaluación de concentración inhibitoria media (IC_{50}), se define la concentración del fungicida en 400 ppm. Los análisis antioxidantes realizados (ABTS, DPPH, y TPC) permitieron evaluar el efecto protector y potenciador del bioinsumo en condiciones normales, determinando así la concentración óptima para maximizar el potencial antioxidante sin comprometer la efectividad del fungicida del cual los ingredientes activos cubren del 10 al 30%; y Surfactantes y Emulsionantes del 2% al 5%; y disolventes hasta un 15% lo cual nos permite un máximo del 50% de bioinsumo sin embargo por consideraciones económicas solo trabajaremos con un máximo del 35% (Shakila et al., 2019)

Tabla 2.1*Esquema de trabajo para la formulación de mezclas para evaluación antioxidante*

N°	Formulación	Bioinsumo	Fungicida	H ₂ O ₂	Análisis	Análisis	Análisis
		CAT (%)	(ppm)	(ppm)	ABTS	DPPH	TPC
1	CAT/BC	5	400	-	X	X	X
2	CAT/BC	10	400	-	X	X	X
3	CAT/BC	15	400	-	X	X	X
4	CAT/BC	20	400	-	X	X	X
5	CAT/BC	25	400	-	X	X	X
6	CAT/BC	30	400	-	X	X	X
7	CAT/BC	35	400	-	X	X	X

Nota. CAT: Catalasa, BC: Fungicida comercial

Luego, para evaluar el impacto del peróxido de hidrógeno en el tratamiento experimental, se formularon nuevas mezclas del bioinsumo enzimático con el fungicida comercial y el agente oxidante, tal como se describe en la Tabla 2.2. A diferencia de las mezclas tabuladas en el párrafo anterior, ahora se incluyen concentraciones de bioinsumo al 10%, 15%, 20%, 25%, y 35%, según los resultados de la evaluación antioxidante de la mezcla entre bioinsumo y fungicida, con la adición de H₂O₂ a 4000 ppm, simulando condiciones oxidativas.

Tabla 2.2*Formulación de mezclas para evaluación antioxidante en presencia de peróxido de hidrógeno*

N°	Formulación	Bioinsumo	Fungicida	H ₂ O ₂	Análisis	Análisis	Análisis
		CAT (%)	(ppm)	(ppm)	ABTS	DPPH	TPC
1	BC	-	400	-	X	X	X
2	BC/PH	-	400	4000	X	X	X
3	CAT/BC/PH	10	400	4000	X	X	X
4	CAT/BC/PH	15	400	4000	X	X	X
5	CAT/BC/PH	20	400	4000	X	X	X
6	CAT/BC/PH	25	400	4000	X	X	X
7	CAT/BC/PH	35	400	4000	X	X	X

Nota. CAT: Catalasa, BC: Fungicida comercial, PH: Peróxido de Hidrógeno

2.5 Ensayos de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de la mezcla entre el fungicida y bioinsumo se evaluó espectrofotométricamente mediante los ensayos DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico). Estas técnicas son ampliamente utilizadas dado que permiten medir la actividad antioxidante en compuestos polares y no polares, ofreciendo una evaluación completa de la capacidad antioxidante de la mezcla.

2.5.1 Determinación de actividad antioxidante mediante ABTS en microplaca

Para evaluar la actividad antioxidante con el método ABTS+ en microplaca, se sigue un protocolo específico y estructurado. Se preparan las soluciones stock mezclando ABTS y persulfato de potasio en agua destilada, alcanzando concentraciones finales de 7 mM y 3.6 mM respectivamente. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad por 24 horas. Luego, la solución de ABTS se diluye en metanol hasta una concentración final de 169 μ M. Paralelamente, se prepara una curva de calibración de Trolox en metanol, con concentraciones entre 20 y 200 ppm.

Para la preparación de la muestra, se disuelve en metanol u otro solvente adecuado, y se diluye según sea necesario para obtener las concentraciones apropiadas para el ensayo. En la microplaca, se añaden 50 μ L de estándar o muestra por triplicado en cada pocillo, seguido de 150 μ L de la solución de ABTS. Se incluye un blanco con 200 μ L de metanol, equivalente a las proporciones usadas en los pocillos. La microplaca se incuba en oscuridad por 30 minutos para permitir el desarrollo de la reacción. Finalmente, se mide la absorbancia a 732 nm mediante espectrofotometría (Choez Guaranda, 2018).

$$\text{Actividad inhibidora de ABTS}^+(\%) = \left(1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}}\right) \cdot 100 \quad (2.1)$$

Nota. Abs. Muestra: Absorbancia de mezcla del bioinsumo y fungicida, Abs. Control: Absorbancia del control

2.5.2 Determinación de actividad antioxidante mediante DPPH en microplaca

Para evaluar la actividad antioxidante mediante el método DPPH. Se prepara una solución stock de DPPH en metanol con una concentración de 156 μM . Paralelamente, se elabora una curva estándar de Trolox en metanol con concentraciones que varían entre 20 y 200 μM , lo cual permite establecer un punto de referencia para la actividad antioxidante de las muestras problema.

La muestra problema se disuelve en metanol u otro solvente no corrosivo apropiado, asegurando que el solvente seleccionado no interfiera con la medición de absorbancia. Esta muestra se diluye en el solvente tantas veces como sea necesario para obtener las concentraciones adecuadas para el análisis.

En la preparación de la microplaca, se agregan 50 μL del estándar o de la muestra problema, por triplicado, en cada pocillo. Posteriormente, se añaden 150 μL de la solución de DPPH a cada pocillo. Se incluye un blanco, compuesto por 200 μL de metanol, en caso de que tanto el DPPH como las muestras se hayan preparado en metanol. La microplaca se incuba en oscuridad durante 30 minutos para permitir que la reacción entre el DPPH y las muestras se desarrolle completamente. Finalmente, se mide la absorbancia a 517 nm utilizando un equipo © de Biotek, lo cual proporciona una medida de la capacidad antioxidante de las muestras evaluadas (Choez Guaranda, 2018).

$$\text{Actividad captadora de DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}}\right) \cdot 100 \quad (2.2)$$

Nota. Abs. Muestra: Absorbancia de mezcla del bioinsumo y fungicida, Abs. Control: Absorbancia del control

2.6 Determinación de fenoles totales

2.6.1 Contenido total de fenoles (TPC) en microplaca

Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante mediante la metodología de Folin-Ciocalteu, se utilizan muestras homogeneizadas y un reactivo de fenol, Folin Ciocalteu, diluido 10 veces a partir del reactivo original. Además, se prepara una solución saturada de Na_2CO_3 al 7,5%, disolviendo 7,5 g de Na_2CO_3 en 100 ml de agua destilada caliente; luego se enfría y se filtra la solución. Para llevar a cabo el procedimiento, primero se debe preparar una curva patrón de ácido gálico. Esto implica la creación de una solución madre de ácido gálico de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, disolviendo 5 mg de ácido gálico en 5 ml de etanol al 80%. Es recomendable preparar tantos tubos como reacciones se necesiten. Posteriormente, se deben preparar 11 tubos Eppendorf de 1,5 ml en hielo. El procedimiento se realiza siempre en hielo, comenzando con la toma de dos microplacas para realizar réplicas técnicas. A cada pozo de la microplaca se le añaden 20 μl del extracto (ya sea el material foliar o la solución de ácido gálico para la curva patrón) y 100 μl del reactivo de Folin Ciocalteu diluido (1:10 v/v). Se deja reaccionar durante 5 minutos en hielo y luego se añaden 80 μl de la solución saturada de Na_2CO_3 al 7,5%. La mezcla se deja reposar en la oscuridad durante una hora, sin necesidad de mantenerla en hielo. Finalmente, se mide la absorbancia de la mezcla de reacción a 760 nm utilizando un lector Biotek de microplacas. El contenido total de polifenoles (TPC) de cada extracto se expresa como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal en peso fresco (Choez Guaranda, 2018).

2.7 Análisis estadístico de propiedades antioxidantes

El análisis de datos estadísticos se mide mediante el software estadístico Minitab versión 22.1.0, utilizando las pruebas de ANOVA con prueba post-hoc Tukey para resultados de distribución

normal y pruebas de diseño de mezcla, agregando los datos de concentración del bioinsumo con respecto al cambio de sus propiedades antioxidantes. Los resultados se representaron gráficamente con gráficos de distribución de letras y grafico de diferencia de medias. Estableciendo un nivel de significancia del 5% para todos los métodos.

2.8 Simulación de producción piloto de bioinsumo

2.8.1 Descripción del proceso de producción

Se realiza la simulación del proceso de producción enzimática piloto mediante datos de producción industrial obtenidos de ejemplos de producción de Bio-materiales en el simulador SuperPro Designer, el ejemplo analiza la producción microbiana de enzimas industriales en estado líquido, utilizando múltiples fermentadores de siembra y producción en modo escalonado.

La simulación se basa en la producción enzimática por fermentación en estado líquido, se redimensiona el proceso a una producción a menor escala, disminuyendo los flujos de entrada a flujos referenciales y simplificar el proceso, también se realizan cambios en condiciones de fermentación según condiciones óptimas de bacteria y enzima.

La Figura 2.6 representa el diagrama de flujo de la simulación de proceso de producción del bioinsumo enzimático a partir de catalasa que consta de 4 etapas,

1. “Preparación de medio liquido” incluye la preparación y esterilización del medio de cultivo, de brindar fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y sales para posteriores fermentadores semilla.
2. “Preparación de inóculo” incluye la preparación del inoculado en incubadora con agitación continua a una temperatura de 37°C y posterior crecimiento bacteriano en fermentadores semilla que tienen como objetivo generar la mayor cantidad de biomasa posible previo a la fermentación.

3. “Producción enzimática por fermentación” se produce la fermentación aerobia usando las fuentes de carbono, nitrógeno, sales (componentes del medio de cultivo) y aire, para la producción final de enzima.
4. “Proceso de purificación del bioinsumo” incluye un filtro rotatorio al vacío, microfiltro y ultra filtro con el objetivo de purificar el bioinsumo enzimático removiendo impurezas, finalmente se realiza la formulación del bioinsumo usando glicerol.

2.8.2 Sección de fermentación

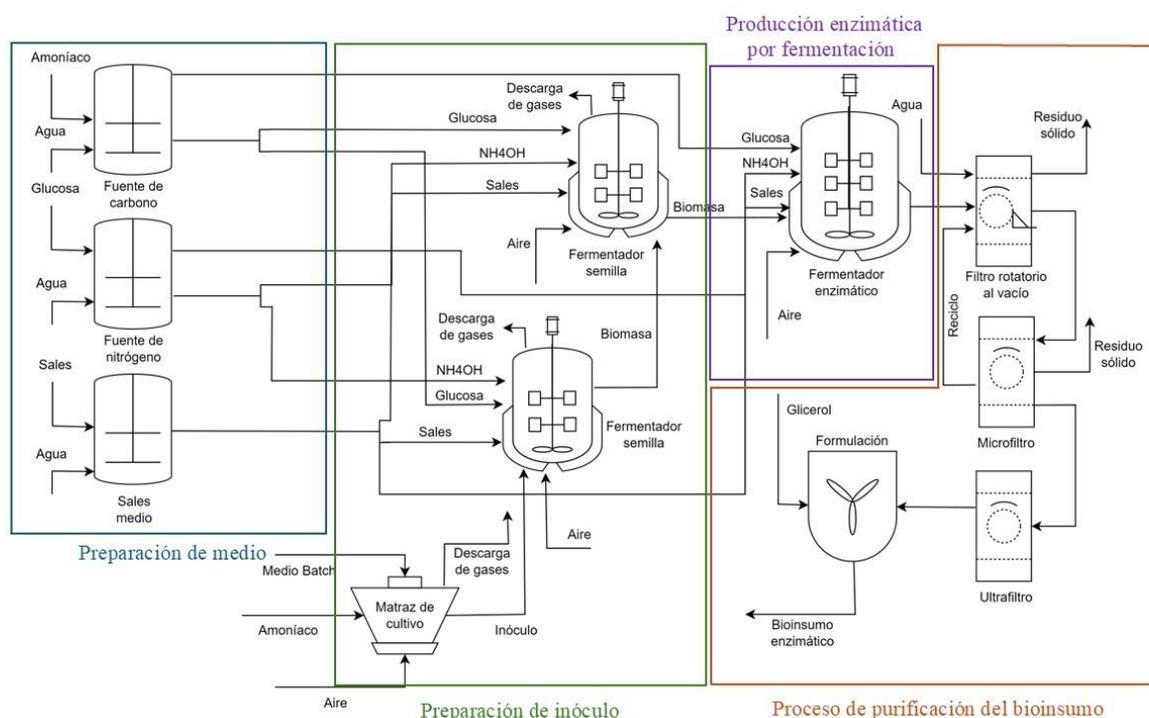
La sección de fermentación incluye las etapas de preparación del inóculo, dentro del matraz de cultivo y los fermentadores de producción. En este proceso, un microorganismo se cultiva aeróbicamente en un proceso por lotes alimentados a 30 °C durante 84 horas para generar una enzima extracelular. Las enzimas industriales suelen requerirse en grandes cantidades, lo que implica el uso de grandes volúmenes de caldo y, por lo tanto, grandes fermentadores.

Se emplea un tren de siembra de un solo paso, se utiliza un décimo de los componentes de siembra utilizados en la simulación base. Este tren consiste en una serie de fermentadores. Los volúmenes reales de los fermentadores son aproximadamente 50 L para el fermentador de siembra y $2m^3$ el fermentador de producción enzimática. El fermentador de siembra de 50 L se inocula con un frasco agitador de 10 L.

El crecimiento microbiano en los fermentadores de siembra, así como en los frascos agitadores, se realiza en modo discontinuo, a 30 °C, durante 36 horas (Ferreira & Petrides, 2020).

Figura 2.6

Diagrama de flujo de la simulación de producción enzimática del bioinsumo agrícola



2.8.3 Operaciones utilizadas

La Tabla 2.3 resume las principales unidades de operación del proceso simulado con su respectivo equipo, donde se detalla la descripción del procedimiento de producción del bioinsumo enzimático a partir de catalasa.

Tabla 2.3

Especificaciones de las operaciones unitarias en el proceso de producción del bioinsumo

Equipos	Nomenclatura	Operación	Descripción
Fermentador	P1/FR-101	SIP (Stream-In-Place)	El fermentador principal produce la enzima final mediante el inóculo, las fuentes de carbono, sales y nitrógeno para el posterior fermentado. Dentro de la operación se especifica la reacción biológica.
		Pull in Glucose (Pull In)	
		Pull in Salts (Pull In)	
		Inoculate (Pull In)	
		Pull in Ammonia (Pull In)	
		Fed Batch Fermentation (Batch Stoich. Fermentation)	
		Transfer to P- (Transfer Out)	
CIP (Clean-In-Place)			
Fermentador semilla	P2/SFR-102	SIP (Stream-In-Place)	Se utilizan dos fermentadores semilla, de 100L y 1m3 como tren de siembra para aumentar la producción de inóculo, comenzando desde un frasco agitador donde comienza el crecimiento
		Pull in Medium (Pull In)	
		Pull in Glucose (Pull In)	
	Pull in Ammonia (Pull In)		
P5/SFR-103	Inoculate (Pull In)		

		Cell Growth (Batch Stoich. Fermentation)	bacteriano. Dentro de la operación se especifica la reacción biológica.
		Transfer to Main Fermenter (Transfer Out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Tanque de agitación (Fuente de nitrógeno)	P7/V-101	Charge water (Charge)	Se realiza en un tanque de agitación la mezcla de hidróxido de amonio y agua, para alimentar los fermentadores de una fuente de nitrógeno adecuada.
		Charge ammonium hydroxide (Charge)	
		Agitate (Agitation)	
		Transfer to Splitter (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Tanque de agitación (Medio salino)	P8/V-102	Charge water (Charge)	Se realiza en un tanque de agitación la mezcla de sales y agua, para alimentar los fermentadores del medio salino.
		Charge Salts (Charge)	
		Agitate (Agitation)	
		Transfer to Splitter (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Tanque de agitación (Fuente de carbono)	P9/V-103	Charge glucose sltn (Charge)	Se realiza en un tanque de agitación la mezcla de glucosa y agua hasta una dilución del 50%.
		Dilute to 50% Glucose (Pull In)	
		Agitate (Agitation)	
		Transfer to Splitter (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Matraz de agitación	P3/SFR-101	Charge medium (Charge)	Comienza el tren se siembra mediante la producción de inóculo en un frasco de agitación de 10L a 30°C.
		Charge ammonia (Pull In)	
		Cell Growth (Batch Stoich. Fermentation)	
		Transfer to Fermentator (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Esterilizador de glucosa	P12/ST-101	Sterilize Glucose (Heat Sterilization)	Esterilizar el flujo de glucosa previo a la alimentación a los fermentadores, para evitar el crecimiento de diferentes bacterias en el cultivo.
Filtro rotatorio al vacío	P6/RVF-101	Apply Pre-coat (Hold)	Remover la mayor cantidad de biomasa del flujo del fermentador principal.
		Filter (Rotary Vacuum Filtration)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Microfiltro	P13/DF-101	Diafilter (Diafiltration)	Filtrar pequeñas partículas o impurezas del fluido. Se emplea para la purificación de la enzima.
		Transfer OUT-1 (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Ultrafiltro	P14/DF-102	Diafilter (Diafiltration)	Filtrar pequeñas partículas o impurezas del fluido. Se emplea para la purificación de la enzima.
		Transfer OUT-1 (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	
Formulación	P15/V-104	Receive Retentate (Transfer in)	Realizar la formulación del producto final de la planta piloto, mezclando la enzima purificada con glicerol para el aumento del tiempo de vida del bioinsumo enzimático.
		Pull in Glycerol (Pull in)	
		Mix (Agitation)	
		Transfer OUT-1 (Transfer out)	
		CIP (Clean-In-Place)	

2.8.4 Ingreso de componentes

Como puede observar en la Tabla 2.4, la simulación requiere parámetros específicos del ingreso de componentes puros y mezclas; inexistentes en la base de datos de “SuperPro Designer”. Por lo que se emplea alternativamente el software ASPEN PROPERTIES V.12, que determinará las propiedades de la sustancia química de interés. Las materias caracterizadas son parte de una mezcla de componentes, donde cada una de ellas deberá ser agregada en la opción (Task/Register Componentes and Mixtures) (SuperPro Designer ® User Guide Water Purification, Wastewater Treatment and Air Pollution Control Processes, n.d.).

Tabla 2.4

Parámetros requeridos para el registro de nuevos componentes en SuperPro Designer.

Propiedades	Especificación
Peso Molecular	Valor en [g/gmol]
Punto normal de ebullición	Valor en [°C]
Temperatura crítica	Valor en [°C]
Presión crítica	Valor en [bar]
Factor de Comprensibilidad	Valor adimensional
Factor acéntrico	Valor adimensional
Densidad	$\rho \left[\frac{g}{l} \right] = a + bT, T[K]$
Capacidad calorífica de líquido/sólido	$C_p \left[\frac{J}{gmol - k} \right] =$ $a + bT + cT^2 + dT^3 + eT^4, T[K]$
Capacidad calorífica de gases	$C_p \left[\frac{J}{gmol - k} \right] =$ $a + bT + cT^2 + dT^3 + eT^4, T[K]$

Coeficientes de Antoine	$\text{Log}(P^{sat}[\text{mmhg}]) = A - \frac{B}{C + T[^\circ\text{C}]}$
-------------------------	--

Nota. Tomado de (Zea, 2023)

2.8.5 Suposiciones

Con la finalidad de cumplir con los grados de libertad y evitar sobre especificación en equipos o procesos, se plantean las siguientes suposiciones en la Tabla 2.5 para efectos de la simulación (Zea, 2023) del desarrollo del bioinsumo enzimático.

Tabla 2.5

Suposiciones del proceso de producción del bioinsumo enzimático

Proceso	Suposición
Tanques de agitación	Modelo de mezcla ideal (agitación y temperatura constante)
	Los componentes se encuentran en fase líquida
	Se trabaja hasta un máximo del 90% de su capacidad volumétrica
Fermentadores	El aire que ingresa a los fermentadores se considera aire estéril
	Los fermentadores semilla aumentan la cantidad de inóculo mediante la producción de "biomasa"
	Se añade a la base de datos de SuperPro Designer las propiedades de la enzima
	El inóculo formado es la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> MO. y la enzima formada es Catalasa.
Filtros	El filtro rotatorio al vacío remueve hasta el 98% de la biomasa restante después de 20h de operación.
	Los coeficientes de retención en el microfiltro son 1 para la biomasa, 0.05 para enzimas y 0.05 para impurezas.

	Los coeficientes de retención en el ultra filtraron son 1 para la biomasa y 0.95 para impurezas.
Matraz de agitación	El matraz de agitación utiliza su propio medio y fuente de nitrógeno para la producción del inóculo.
	Se añade a la base de datos de SuperPro Designer las propiedades del medio que ingresa al matraz

2.8.6 Validación de la simulación

La simulación de proceso de producción del bioinsumo enzimático a partir de catalasa es dividido en 4 etapas, La simulación se validó a través de la comparación de resultados técnicos de producción de enzimas de la simulación de producción industrial realizado por Ferreira & Petrides, según la cantidad proporcional de enzima según el flujo de medio de cultivo. Se utilizó la Ecuación descrita para determinar el porcentaje de error entre los valores de la simulación a escala piloto redimensionada con los valores citados de la simulación base (Ferreira & Petrides, 2020).

$$\%ERROR = \frac{|Valor simulación citada - Valor simulación|}{Valor simulación} \quad (2.3)$$

2.8.7 Proyección tecno económica

Mediante el simulador empleado, SuperPro Designer ®, se determinó el valor actual neto (VAN), tiempo interno de retorno (TIR) y el periodo de recuperación (PBP). La determinación de estos índices permite una referencia para saber el costo operativo de la planta si el proyecto se busca implementar en conjunto a la producción de productos antifúngicos y su rentabilidad a largo plazo.

Capítulo 3

3.1 Determinación de actividad enzimática

Con la finalidad de determinar la efectividad del bioinsumo con respecto a los radicales oxidativos de peróxido de hidrógeno, La tabla 3.1 determina la actividad enzimática mediante el procedimiento espectrofotométrico de microplaca. Se realizaron 5 lecturas periódicas por minuto y se dividieron las muestras del bioinsumo enzimático por lotes, producción y sustrato.

Tabla 3.1

Actividad enzimática de las producciones de bioinsumo usando sustratos de lenteja y garbanzo

Substrato	Producción	Tiempo de incubación (min)					PROM.	Cv.	Ref.
		A. CAT (kU)							
		1	2	3	4	5			
Muestra lenteja B1	1	2.07	1.90	1.76	1.62	1.51	1.84±0.22	12.54	No existe referencias utilizando el mismo método de determinación enzimática
Muestra lenteja B2		0.24	0.21	0.18	0.15	0.14	0.19±0.04	23.76	
Muestra lenteja B3		0.34	0.26	0.22	0.18	0.17	0.24±0.07	28.65	
Muestra garbanzo B1	1	0.44	0.41	0.36	0.36	0.33	0.39±0.05	12.01	
Muestra garbanzo B2		0.09	0.07	0.05	0.05	0.04	0.06±0.02	32.02	
Muestra garbanzo B3		1.07	0.89	0.86	0.81	0.75	0.91±0.11	13.80	
Muestra lenteja B1	2	0.27	0.22	0.20	0.18	0.17	0.22±0.04	19.44	
Muestra lenteja B2		0.17	0.12	0.10	0.08	0.08	0.12±0.04	34.21	
Muestra lenteja B3		0.22	0.19	0.18	0.15	0.14	0.19±0.03	18.89	
Muestra garbanzo B1	2	1.95	1.79	1.68	1.55	1.44	1.74±0.20	11.72	
Muestra garbanzo B2		1.24	1.13	1.04	0.96	0.89	1.09±0.14	13.02	
Muestra garbanzo B3		0.61	0.56	0.52	0.48	0.45	0.54±0.06	12.38	
Muestra lenteja B1	3	0.24	0.22	0.20	0.18	0.17	0.21±0.03	15.61	
Muestra lenteja B2		0.07	0.06	0.05	0.04	0.04	0.05±0.01	27.37	
Muestra lenteja B3		0.08	0.07	0.06	0.04	0.03	0.06±0.02	37.35	
Muestra garbanzo B1	3	0.90	0.82	0.75	0.69	0.66	0.79±0.10	13.04	
Muestra garbanzo B2		0.38	0.35	0.31	0.28	0.27	0.33±0.05	14.51	
Muestra garbanzo B3		0.37	0.33	0.31	0.29	0.27	0.32±0.04	12.04	

Nota: Valores representan el promedio±desviación estándar, B (Lote Batch), PROM.: Promedio de las actividades de catalasa, Cv.: Coeficiente de Variación, Ref.: Referencias

Los lotes se diferencian debido a la calidad del inóculo utilizado en la experimentación. La homogeneidad del traslado de la bacteria al caldo bacteriano promueve diferencias en el crecimiento del microorganismo. La experimentación plantea desafíos de reproducibilidad debido a la naturaleza heterogénea del proceso debido a la variabilidad del sustrato en porosidad, tamaño de partícula y composición de nutrientes. Estas variaciones pueden dar lugar a diferencias en el crecimiento

microbiano y el rendimiento de los productos en el lecho del sustrato (Oiza et al., 2022).

En los resultados obtenidos de la actividad enzimática de la catalasa, se observa una correlación inversa entre el tiempo de incubación y la actividad enzimática. A medida que se prolonga el tiempo de exposición, el peróxido de hidrógeno se descompone progresivamente debido a la acción catalítica de la enzima. Este proceso de descomposición, donde el peróxido de hidrógeno se convierte en agua y oxígeno, se traduce en la lectura exclusivamente del peróxido de hidrógeno sin reaccionar. La disminución entre absorbancias de las muestras a diferentes tiempos de incubación se debe a la baja velocidad de reacción catalítica, el método fue adaptado a la medición de actividad enzimática del fermentado en estado sólido, sin embargo, el método fue diseñado para muestras biológicas como sangre y tejidos (Hadwan et al., 2024).

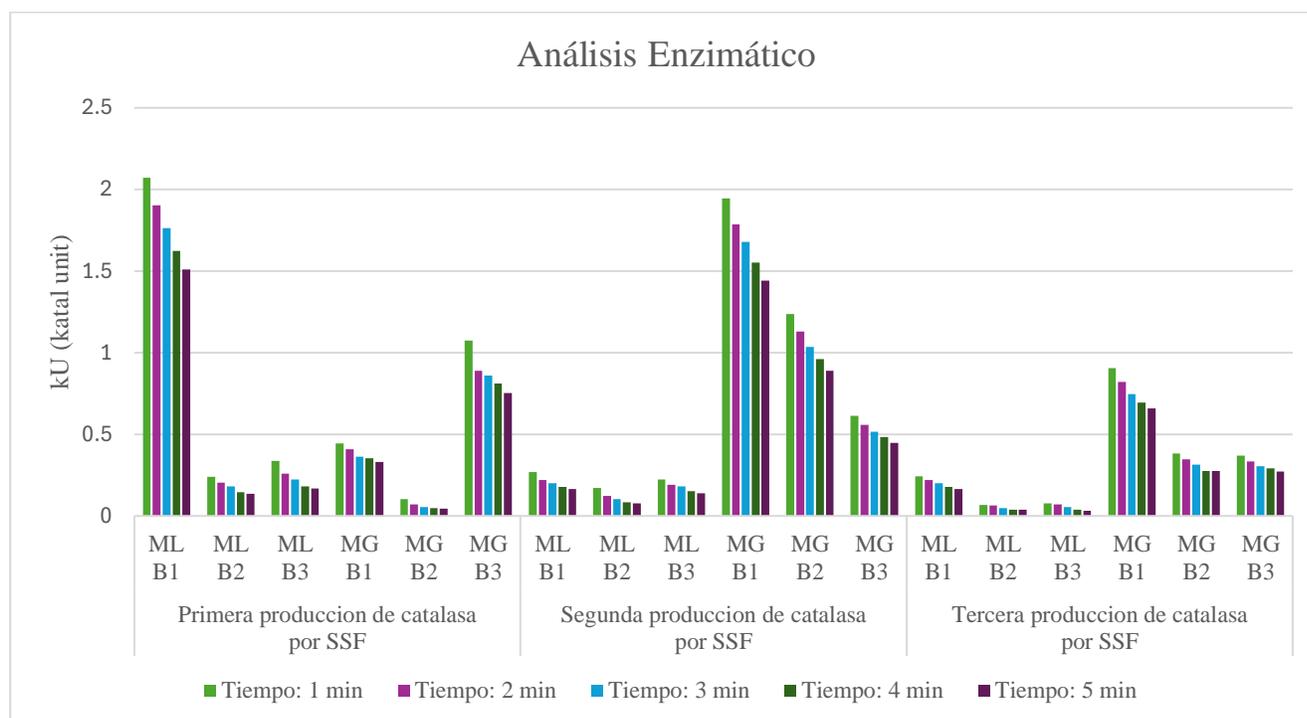
Los resultados obtenidos entre lecturas periódicas presentan menor coeficientes de variación en los lotes que usaron garbanzo como sustrato con respecto al uso de lenteja, obteniendo valores menores al 30%, exceptuando el coeficiente de variación presentado en el lote 2 de la primera producción con 0.06 ± 0.02 kU. El resto de los valores presentados para los lotes de garbanzo tienen un coeficiente menor al 20% indicando que la estimación de actividad enzimática es precisa y la media como medida de posición central, presenta confiabilidad.

Los sustratos como subproductos agrícolas proporcionan una rica fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano y formación de bioproductos valiosos como enzimas, biopesticidas, biofloculantes, aromas y pigmentos durante el SSF (de Menezes et al., 2024). La figura 3.1 es una representación gráfica de la tabla 3.1. Se demuestra mayor actividad enzimática en el sustrato de garbanzo, el garbanzo es un sustrato óptimo debido a que presenta una alta cantidad de fuentes de carbono presentes, aumento de proteínas sólidos solubles, ácidos grasos y taninos reducidos (Paredes-Lopez et al., 1991). El lote de garbanzo que presenta mayor actividad enzimática es el tercer lote de la segunda producción con una actividad de 1.74 ± 0.20 kU (katal unit).

Los valores de actividad enzimática de ambos sustratos no son descritos en literatura. La metodología utilizada para la medición de actividad enzimática no es descrita por el artículo base de producción.

Figura 3.1

Actividad enzimática de las producciones de bioinsumo usando sustratos de lenteja y garbanzo



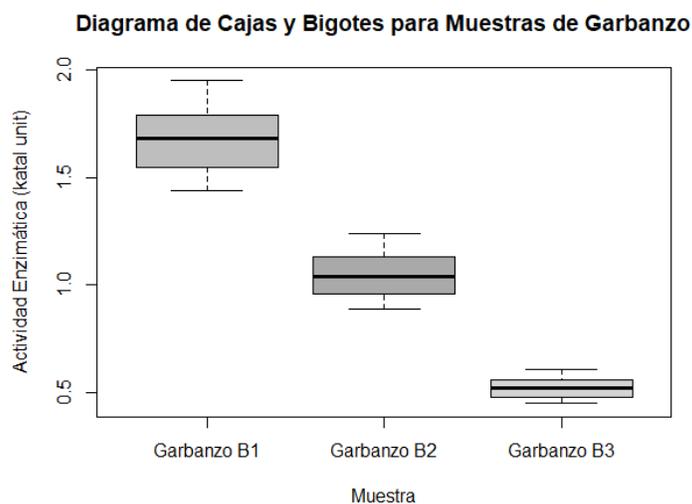
3.1.1 Análisis estadístico de la producción enzimática

La figura 3.2 es un gráfico de cajas y bigotes de los valores de la actividad enzimática de la segunda producción del bioinsumo de los lotes de garbanzo, grupo del que se toma el bioinsumo a utilizar en las siguientes pruebas, el gráfico sugiere diferencias significativas entre las 3 muestras, la muestra de garbanzo B1 tiene la mayor actividad enzimática promedio y variabilidad, la muestra de garbanzo B2 con valores moderados y la muestra de garbanzo B3 con menor actividad y variabilidad. Con respecto a los resultados se utilizará el segundo lote de garbanzo de la segunda producción con una actividad enzimática de 1.09 ± 0.14 kU (Katal Unit) para las posteriores pruebas antioxidantes en

microplaca y análisis usando fungicida comercial.

Figura 3.2

Diagrama de Cajas y Bigotes para la segunda producción de Muestra de Garbanzo



3.2 Determinación de actividad antioxidante

3.2.1 Determinación de IC_{50} mediante técnica espectrofotométrica DPPH

Los valores reportados en la tabla 3.2 muestran la gráfica IC_{50} del producto Fungicida comercial. Se trazaron los valores de porcentaje de inhibición del reactivo de DPPH en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas los valores de concentración que corresponden a disoluciones seriadas a la mitad iniciando desde 2000 ppm.

Los puntos siguen la tendencia de la línea de regresión con un R cuadrado de 0.9887, se obtiene la ecuación de la recta y mediante el reemplazo de la incógnita de las ordenadas con el 50% de inhibición, se obtiene una concentración de 415.46 ppm de Fungicida comercial.

Se utiliza una concentración de 400 ppm a la que el producto inhibe alrededor de un 50% del reactivo para los posteriores análisis de antioxidantes. Aumentando la precisión en el análisis del comportamiento de su actividad antioxidante si se trabaja al 50% de inhibición debido a la facilidad

de notar aumentos o caídas de actividad antioxidante. Esta concentración determina la capacidad antioxidante original del fungicida, la decaída con peróxido de hidrógeno y como beneficia al fungicida la adición de la catalasa.

Tabla 3.2

Tabla del IC₅₀ del Fungicida comercial evaluando la actividad antioxidante según la técnica DPPH

Concentración ppm	%INH ^a	R ²	Formula Concentración vs INH	Ref.
2000	98.76	0.9887	$y = 0.0801x + 16.721$	<i>No hay referencia de la concentración IC₅₀ del fungicida</i>
1000	94.17			
500	62.37			
250	36.28			
125	27.97			
62.5	20.45			
31.25	15.60			
15.625	19.17			

3.2.2 Análisis antioxidante por técnica espectrofotométrica DPPH y ABTS

Para evaluar la eficacia del bioinsumo en mejorar la protección contra agentes oxidativos del producto Fungicida comercial, se realizaron pruebas de mezcla entre el fungicida y el bioinsumo enzimático hasta una concentración máxima del 35% del bioinsumo, realizando pruebas del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% y 35% a una misma concentración del IC₅₀ de Fungicida comercial a 400ppm.

En la figura 3.4 se denota el comportamiento de la actividad antioxidante con respecto a las concentraciones del bioinsumo mediante la técnica DPPH, siendo la mayor actividad antioxidante la presentada para la concentración a 15%. Mediante el análisis ANOVA con prueba post-hoc Tukey determinamos que no hay diferencias significativas entre el 10%, 15% y 20%, debido a esto se toma la concentración del 10% menor tomando en cuenta consideraciones económicas.

La figura 3.4 establece que la concentración del bioinsumo en presencia del peróxido de hidrógeno presenta una mejora en la inhibición sin embargo esta mejora no es proporcional a la concentración de bioinsumo.

La figura 3.4 también describe el comportamiento de la actividad antioxidante entre la mezcla del bioinsumo y biofungicida según la técnica de ABTS, esta presenta una relación inversamente proporcional al bioinsumo. Lo cual denota que existe mayor presencia de biocomponentes antioxidantes polares en el biofungicida, disminuyendo a medida que disminuye su proporción.

Se analiza estadísticamente la actividad antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/ml}$) de la técnica DPPH y ABTS, definiendo las concentraciones de bioinsumo al 10%, 15% y 20% como concentraciones con mayor correlación. Debido a esto se realizaron pruebas utilizando peróxido de hidrógeno en las mezclas mencionadas para observar el comportamiento de su capacidad antioxidante en presencia de los radicales del peróxido de hidrógeno.

Los resultados presentados en la tabla 3.3 y tabla 3.4 presentan mezclas realizadas entre el bioinsumo y biofungicida con presencia de peróxido de hidrógeno a una concentración definida de 4000ppm, considerando concentraciones mencionadas por el cliente, la literatura demuestra que a 200ppm hay una reducción de la carga bacteriana y fúngica del 93% y 81.2% (Kriem et al., 2023).

El análisis preliminar de la actividad antioxidante de las mezclas de la figura 3.4 permite la selección de las mezclas de análisis antioxidante en presencia de peróxido de hidrógeno seleccionando las de mejor respuesta, siendo estas 10%, 15%, 20% y 25%. Sin embargo, se sugiere que debido a la mitigación del peróxido de hidrógeno mediante la reacción catalítica del bioinsumo no hay diferencias significativas entre ninguno de los resultados antioxidantes para la técnica de DPPH y en la técnica de ABTS presenta mejor actividad en las concentraciones de 10%, 15% y 20%.

Los resultados de la figura 3.5 sugieren que al agregar el peróxido de hidrógeno el bioinsumo enzimático provoca la acción de la catalasa en la protección de biomoléculas contra el daño

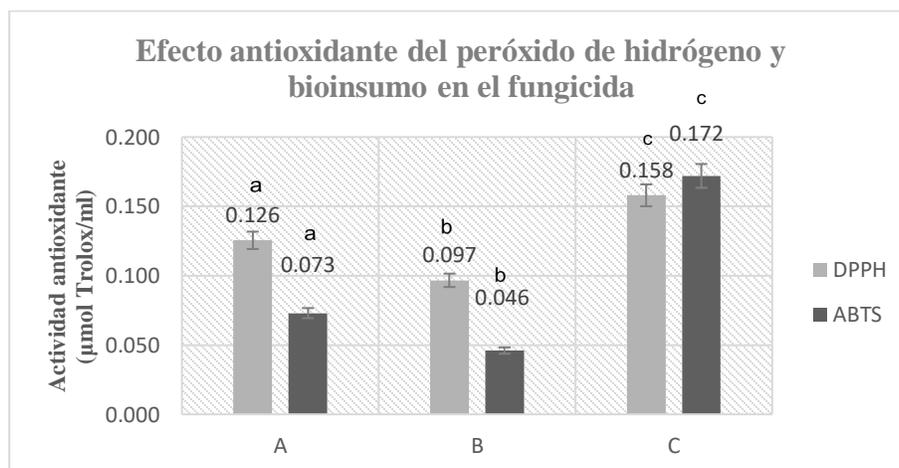
oxidativo, descomponiendo el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno. La actividad enzimática del bioinsumo determina la velocidad de reacción, evitando el descenso de su actividad antioxidante (Piotrowska-Długosz, 2019).

La figura 3.3, presenta según el análisis antioxidante DPPH, el Fungicida comercial (Muestra 1) tiene una actividad antioxidante de 1.26 ± 0.02 $\mu\text{mol Trolox/ml}$. La mezcla entre Fungicida comercial y peróxido de hidrógeno (Muestra 2) disminuye la actividad antioxidante a 0.097 ± 0.012 $\mu\text{mol Trolox/ml}$. Mientras que a la concentración optima definida de bioinsumo del 10%, Fungicida comercial, peróxido de hidrógeno presenta un aumento del 0.158 ± 0.042 .

La figura 3.3, presenta según el análisis antioxidante ABTS, el fungicida comercial (Muestra 1) tiene una actividad antioxidante de 0.073 ± 0.02 $\mu\text{mol Trolox/ml}$. La mezcla entre Fungicida comercial y peróxido de hidrógeno (Muestra 2) disminuye la actividad antioxidante a 0.046 ± 0.012 $\mu\text{mol Trolox/ml}$. Mientras que a la concentración optima definida de bioinsumo del 10%, Fungicida comercial, peróxido de hidrógeno presenta un aumento del 0.172 ± 0.042 .

Figura 3.3

Efecto de la actividad antioxidante del fungicida añadiendo peróxido de hidrógeno y bioinsumo

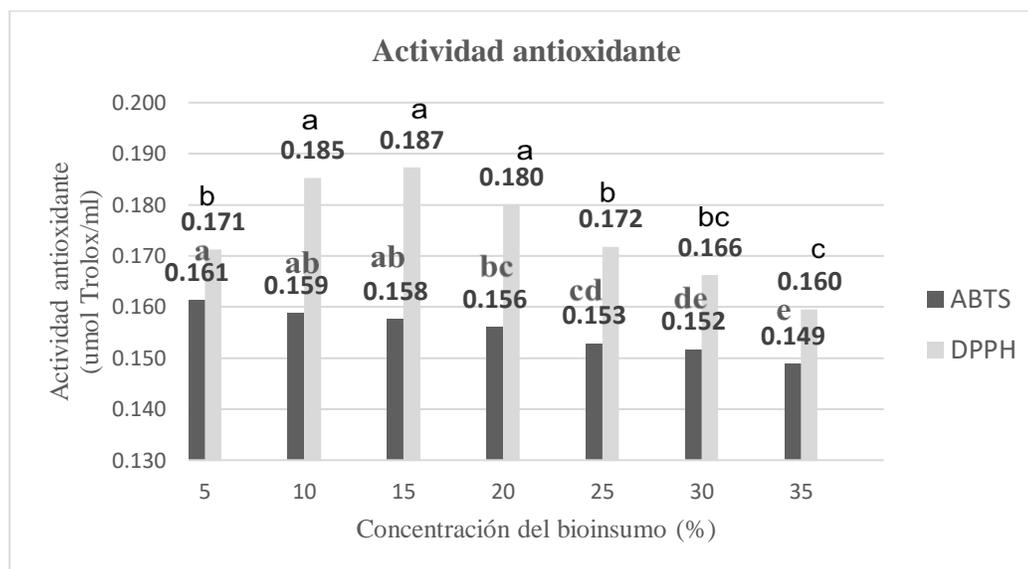


Nota: A) Fungicida comercial B) Fungicida comercial y peróxido de hidrógeno C) Fungicida comercial, peróxido de hidrógeno y Bioinsumo. Las concentraciones de medición fueron 400 ppm

de Fungicida comercial, 4000ppm de peróxido de hidrógeno y 10% de Bioinsumo enzimático.

Figura 3.4

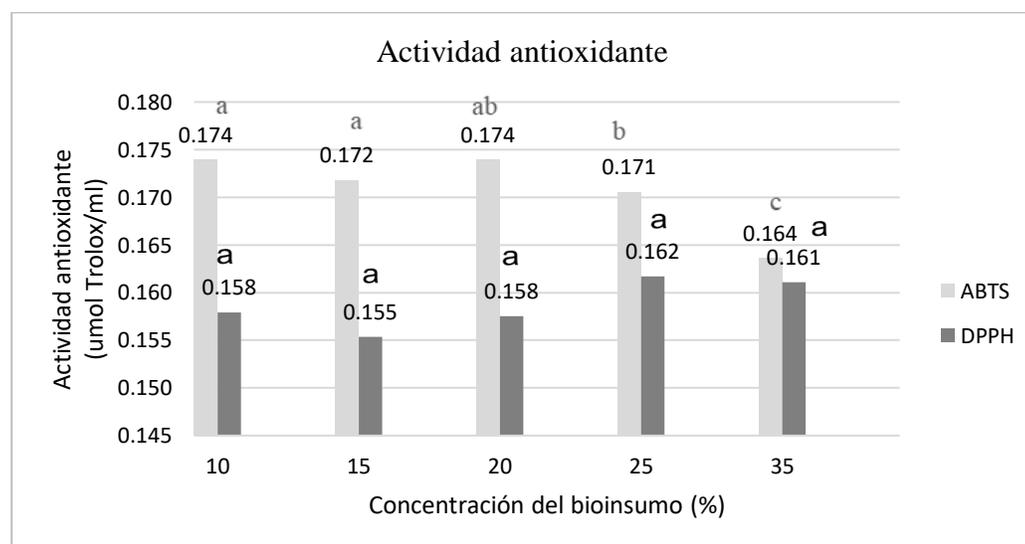
Evaluación antioxidante de mezcla entre el bioinsumo y fungicida



Nota: En las barras, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$)

Figura 3.5

Evaluación antioxidante de mezcla entre el bioinsumo y fungicida en presencia de peróxido de hidrógeno



Nota: En las barras, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$)

Tabla 3.3 *Actividad antioxidante del fungicida por técnica DPPH*

	Muestras	Concentración	%INH^a	μmol Trolox/ml^a	Ref.
Muestra 1	Fungicida comercial	400ppm	43.52	0.126 ± 0.063	
Muestra 2	Fungicida comercial	400ppm	25.15	0.097 ± 0.049	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 3	Fungicida comercial	400ppm			
	Bioinsumo catalasa	10%	64.18	0.158 ± 0.042	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 4	Fungicida comercial	400ppm			No existe referencias del aumento de la capacidad antioxidante del fungicida en presencia de catalasa
	Bioinsumo catalasa	15%	62.52	0.155 ± 0.078	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 5	Fungicida comercial	400ppm			
	Bioinsumo catalasa	20%	62.53	0.158 ± 0.080	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 6	Fungicida comercial	400ppm			
	Bioinsumo catalasa	25%	63.89	0.162 ± 0.078	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 7	Fungicida comercial	400ppm			
	Bioinsumo catalasa	35%	66.16	0.161 ± 0.078	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			

Nota: ^a Media de mediciones por cuatriplicado.

Tabla 3.4 *Actividad antioxidante del fungicida por técnica ABTS*

	Muestras	Concentración	%INH^a	μmol Trolox/ml^a	Ref.
Muestra 1	Fungicida comercial	400ppm	39.00	0.073 ± 0.005	
Muestra 2	Fungicida comercial	400ppm	22.86	0.046 ± 0.001	
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			

Muestra 3	Fungicida comercial	400ppm	96.66	0.172 ± 0.002	No existe referencias del aumento de la capacidad antioxidante del fungicida en presencia de catalasa
	Bioinsumo catalasa	15%			
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 4	Fungicida comercial	400ppm	97.90	0.174 ± 0.002	
	Bioinsumo catalasa	10%			
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 5	Fungicida comercial	400ppm	97.90	0.174 ± 0.001	
	Bioinsumo catalasa	20%			
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 6	Fungicida comercial	400ppm	95.93	0.171 ± 0.001	
	Bioinsumo catalasa	25%			
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			
Muestra 7	Fungicida comercial	400ppm	91.86	0.164 ± 0.002	
	Bioinsumo catalasa	35%			
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm			

Nota: ^a Media de mediciones por cuatriplicado.

3.3 Cuantificación de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu

Este análisis se fundamenta en la cuantificación de fenoles, compuestos reconocidos por propiedades antioxidantes, y examina cómo su concentración varía en función de diferentes condiciones experimentales.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un agente oxidante altamente reactivo, es conocido por su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (EROS). Las EROS, como el radical hidroxilo (•OH), son capaces de iniciar reacciones en cadena que resultan en la oxidación de compuestos biológicos, incluyendo los fenoles (Juan et al., 2021). Este radical hidroxilo, debido a su alta reactividad, oxida rápidamente los fenoles, lo que disminuye su concentración, este fenómeno es claramente evidenciado en la reducción drástica de los niveles de fenoles en la muestra tratada con H₂O₂, donde se observa una disminución significativa del fungicida comercial el cual presenta 14.7 ± 1.484 mg AG/L y disminuye hasta 6.27 ± 0.184 mg AG/L. La notable diferencia en la concentración de fenoles entre las condiciones experimentales puede explicarse por la acción continua del H₂O₂ y la consecuente formación de EROS.

Es importante destacar que el proceso de filtrado no separa la catalasa de los distintos componentes presentes en el fermentado. Extractos de frutos y plantas contienen metabolitos secundarios como terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos (Cenobio-Galindo et al., 2024), Estos componentes sugieren estar presentes en el producto final.

Se sugiere que los compuestos fenólicos impactan las membranas celulares y mitocondriales de los hongos, provocando una despolarización que interfiere con los gradientes iónicos esenciales para la producción de energía y el mantenimiento de la homeostasis celular (Padilha da Silva et al., 2024).

Los compuestos fenólicos son inhibidores de enzimas clave como las quitinasas, lo que impide el correcto mantenimiento y remodelación de la pared celular, debilitando así la estructura del hongo. Parte del mecanismo de acción es la capacidad para modular la expresión génica en los hongos, esto afecta procesos vitales del patógeno como la regulación de su ciclo celular, alterar la velocidad de crecimiento, el desarrollo y reproducción del hongo (Gong et al., 2023).

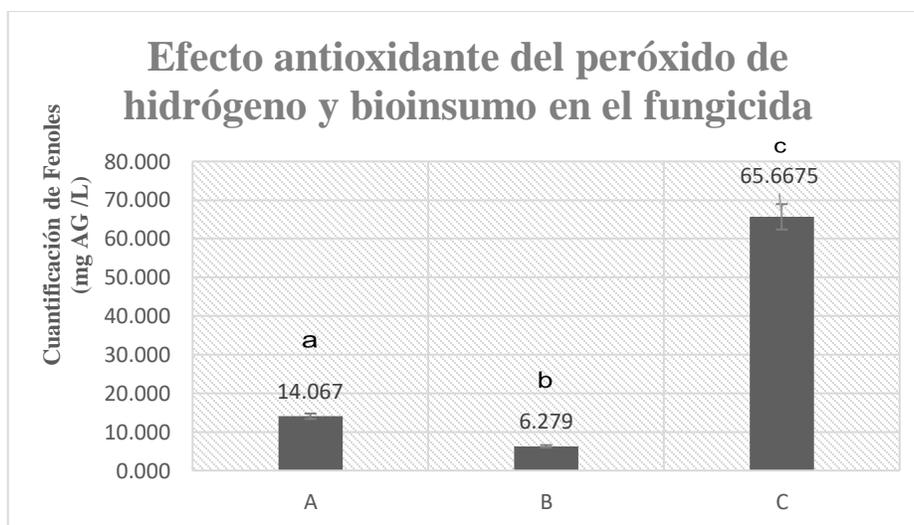
La baja concentración de fenoles en un fungicida sugiere que se encuentra expuesto al daño causado por la oxidación y los beneficios de la presencia de fenoles en el fungicida no son completamente expresados, ya que los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno no son neutralizados de manera eficiente. El daño por oxidación puede degradar componentes activos del fungicida, debido a la mayor susceptibilidad a la degradación oxidativa el fungicida puede perder eficacia.

La figura 3.7 muestra las pruebas de mezcla entre el fungicida y el bioinsumo enzimático hasta una concentración máxima del 35% del bioinsumo denotando una correlación directamente proporcional entre la cantidad de fenoles y la concentración del bioinsumo. El diagrama de letras se denota diferencias significativas entre cada grupo por lo que el aumento de concentraciones es significativo en la cuantificación de fenoles.

La presencia de fenoles en el bioinsumo permite auxiliar en la mitigación de la acción del peróxido de hidrógeno debido a sus capacidades antioxidantes. La figura 3.8 denota que todas las pruebas de mezcla en peróxido de hidrógeno son mayores al control negativo, es decir el Fungicida comercial.

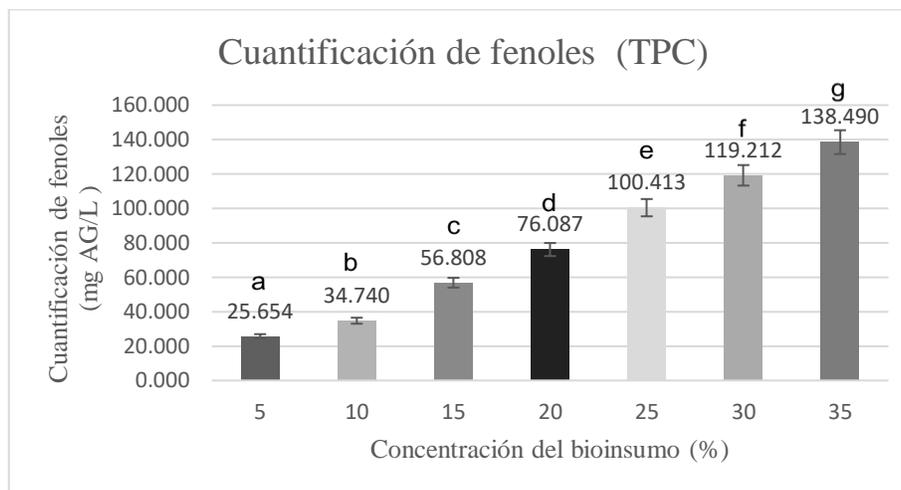
La figura 3.6 denota la cantidad de fenoles del Fungicida comercial, su reducción por la presencia de peróxido de hidrógeno y su aumento mediante el bioinsumo enzimático al 10%. Las diferentes evaluaciones del fungicida y el bioinsumo con peróxido de hidrógeno son detalladas en la tabla 3.5.

Figura 3.6 Efecto de la cuantificación de fenoles del fungicida añadiendo peróxido de hidrógeno y bioinsumo



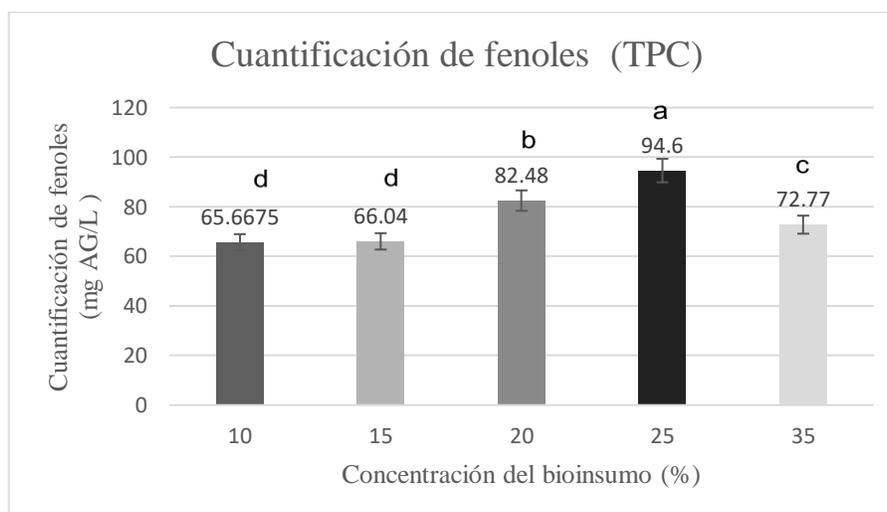
Nota: A) Fungicida comercial B) Fungicida comercial y peróxido de hidrógeno C) Fungicida comercial, peróxido de hidrógeno y Bioinsumo. Las concentraciones de medición fueron 400 ppm de Fungicida comercial, 4000ppm de peróxido de hidrógeno y 10% de Bioinsumo enzimático.

Figura 3.7 Evaluación de mezcla entre el bioinsumo y fungicida



Nota: En las barras, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$)

Figura 3.8 Efecto de la cuantificación de fenoles del fungicida añadiendo peróxido de hidrógeno y bioinsumo



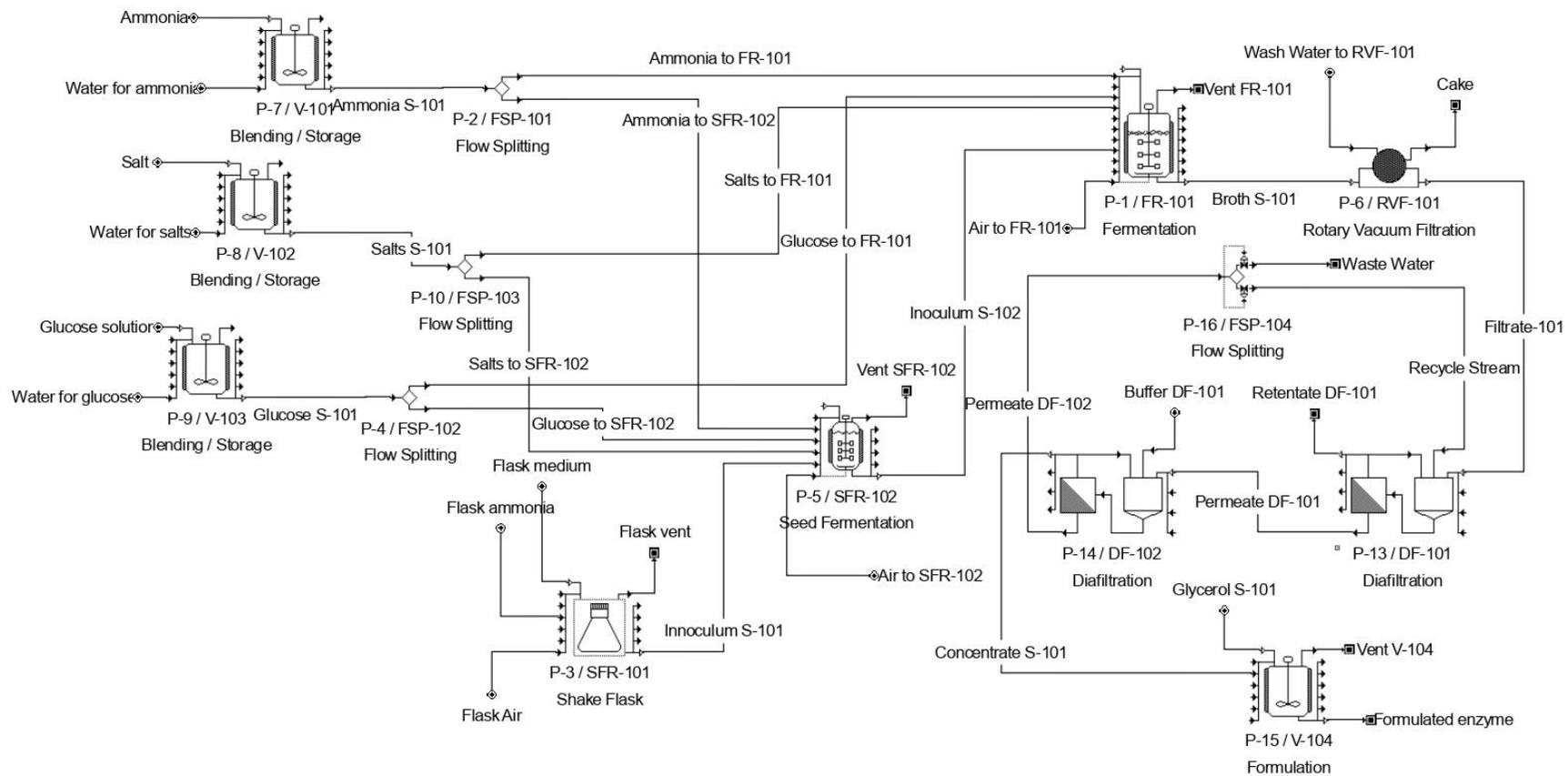
Nota: En las barras, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$)

Tabla 3.5 Cuantificación de fenoles del fungicida

	Muestras	Concentración	mg AG /L	Ref.
Muestra 1	Fungicida comercial	400ppm	14.07 ± 1.484	
Muestra 2	Fungicida comercial	400ppm	6.28 ± 0.184	No existe referencias del aumento de la cantidad de fenoles del fungicida en presencia de catalasa
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm		
Muestra 3	Fungicida comercial	400ppm	65.65 ± 0.457	
	Bioinsumo catalasa	10%		
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm		
Muestra 4	Fungicida comercial	400ppm	66.04 ± 1.105	
	Bioinsumo catalasa	15%		
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm		
Muestra 5	Fungicida comercial	400ppm	82.481 ± 1.295	
	Bioinsumo catalasa	20%		
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm		
Muestra 6	Fungicida comercial	400ppm	94.60 ± 5.027	
	Bioinsumo catalasa	25%		
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm		
Muestra 7	Fungicida comercial	400ppm	72.77 ± 1.409	
	Bioinsumo catalasa	35%		
	Peróxido de hidrógeno	4000ppm		

3.4 Validación de la simulación

Figura 3.9
Diagrama de flujo de la simulación de producción enzimática del bioinsumo



Luego de validar los beneficios del bioinsumo y su efectividad, se simuló el proceso de producción enzimático en estado líquido en el software de simulación, las diferencias principales entre el proceso a escala de laboratorio es el mayor rendimiento de obtención de enzima y la formulación utilizando glicerol, el cual es un componente que permite aumentar el tiempo de vida del producto.

En la tabla 3.6 se detallan los valores finales de producción enzimática de salida del fermentador semilla y fermentador de producción principal y se comparan con la simulación base. La comparación de los casos presenta un porcentaje de error menor al 5%, permitiendo determinar la incidencia de la pérdida de dos fermentadores semilla es mínima y el escalamiento del proceso apropiado, igualmente indica que los resultados de simulación son fiables y se realizó de manera adecuada el escalado del proceso piloto.

Tabla 3.6 Comparación de datos de simulación

Equipos	Línea	Parámetros	Datos experimentales	Datos simulados (Escalamiento 1:10)	Error (%)
Fermentador (SFR-102)	Broth S-101	Flujo másico de biomasa (MT)	7.28MT de biomasa	0.073MT de biomasa	0.27%
Formulación (V-104)	Formulated enzyme	Flujo másico de enzima (MT)	7.11MT de enzima	0.0712MT de enzima	0.14%

3.5 Análisis de rentabilidad

Se realizó un estudio económico con el fin de evaluar la rentabilidad de una planta de producción enzimática utilizando un tren de carga de insumos como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y medio salino, Con la herramienta económica del simulador Super Pro Designer ® de determinó el de operación de la planta teniendo en cuenta el consumo de energía y agua de los

equipos, el trabajo de los operadores, la materia prima y su tratamiento previo, dando como resultado un costo de producción por kilogramo de enzima de \$37.01. Definiendo el precio de venta según un estudio del mercado de venta enzimático, definiendo este en \$65.00 por kilogramo.

Se detalla en la tabla 3.7 la tabla de flujo efectivo o cash Flow, denotando un flujo neto de cada año según los valores de ingreso y costos anuales de operación, comenzando desde el costo de inversión inicial, hasta el tercer año operativo de la planta donde se cumple el plazo PBP de 2.03 años indicando que se genera un excedente luego de cubrir costos, después de cumplir el tiempo de retorno, este excedente puede ser empleado para financiamiento y crecimiento empresarial, según estándares de costos la pureza de la enzima es un factor importante en la determinación del costo pudiendo llegar inclusive \$60.55 (Merck, 2024).

Tabla 3.7 *Flujo efectivo*

Período (año)	Flujo neto generado
0	\$ (301,000.00)
1	\$ (217,000.00)
2	\$ (39,000.00)
3	\$ 139,000.00
4	\$ 317,000.00
5	\$ 495,000.00
6	\$ 673,000.00
7	\$ 851,000.00
8	\$ 1,029,000.00
9	\$ 1,207,000.00
10	\$ 1,385,000.00

Se realiza la evaluación de la factibilidad del proyecto, tomando en cuenta los criterios dentro de la Tabla 3.7. Se calculó el valor actual neto (VAN), utilizando el costo de oportunidad o tasa de descuento del 7% obteniendo un valor final de \$754,000.

Este valor representa la diferencia entre el valor de flujos de la caja de inversión futura y la inversión inicial del proyecto, un valor positivo de valor actual neto indica que la inversión es rentable y genera un mayor valor que el costo de la planta. Este valor representa que el proyecto genera un valor adicional de \$754,000 unidades monetarias según la evaluación económica para el periodo actual del 2024.

Tabla 3.8 *Criterios de rentabilidad de la planta de producción enzimática*

Criterio	Valor
VAN	\$ 754,000.00
TIR	30,95%
PBP	2.03 años

El porcentaje de la tasa interna de retorno (TIR) fue de 30.95% que se comparó con la tasa de descuento en Ecuador del 12%. Esto indica que la inversión es altamente atractiva y rentable. Al invertir en este proyecto, se obtendría un rendimiento significativamente superior al costo de oportunidad, el cual es representado por la tasa de descuento del 12% en Ecuador cubriendo el costo de capital y proporcionar un rendimiento adicional. El proyecto no solo cubrirá el costo de oportunidad del capital, también generará un retorno adicional del 18.95%

Finalmente, se corrobora la viabilidad del proyecto mediante la obtención del tiempo de retorno (PBP) que es de 2.03 años, es decir se necesita esa cantidad de años para recuperar los fondos gastados o alcanzar el equilibrio, siendo esta una inversión que tendrá ganancias a medio plazo considerando el plazo requerido.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

Se logró producir un bioinsumo enzimático basado en catalasa utilizando lenteja amarilla y garbanzo tostado como sustratos, evidenciando su potencial antioxidante para mejorar el tratamiento postcosecha del banano. El bioinsumo desarrollado presentó una actividad enzimática notable, lo que sugiere su viabilidad para aplicaciones en la preservación y calidad del banano postcosecha.

Se determinó que el garbanzo es un sustrato más eficaz que la lenteja para la producción de bioinsumo basados en catalasa, lo cual se evidenció por la mayor actividad enzimática del lote 2 de la segunda producción, alcanzando 1.09 ± 0.14 kU.

La adición de un 10% de bioinsumo al biofungicida comercial, en presencia de peróxido de hidrógeno, mejoró la actividad antioxidante de la mezcla, con un incremento en la actividad DPPH de 0.097 ± 0.012 $\mu\text{mol Trolox/ml}$ a 0.158 ± 0.042 $\mu\text{mol Trolox/ml}$ y en la actividad ABTS de 0.046 ± 0.012 $\mu\text{mol Trolox/ml}$ a 0.172 ± 0.042 $\mu\text{mol Trolox/ml}$. Además, la cuantificación de fenoles totales mostró un aumento en la concentración de fenoles, alcanzando 55.6675 mg AG/L.

Se demostró que la simulación del proceso a escala piloto para la producción de enzima destinado al tratamiento postcosecha del banano, utilizando el software SuperPro Designer®, se logró producir aproximadamente 700 kg de enzima por ciclo de producción a través de un proceso de fermentación en estado líquido. Los resultados del análisis económico son concluyentes: se obtuvo un Valor Actual Neto (VAN) de \$754,000, una Tasa Interna de Retorno (TIR) del 30.95% y un Período de Recuperación de la Inversión (PBP) de 2.03 años.

4.1.2 Recomendaciones

Para evaluar la efectividad antifúngica del bioinsumo, se deben realizar pruebas in vitro utilizando cultivos de hongos patógenos comunes en el banano postcosecha, como *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum musae*. Estas pruebas pueden incluir ensayos de difusión en agar y ensayos de inhibición del crecimiento micelial. Es importante determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del bioinsumo para cada hongo patógeno. Los resultados de estas pruebas proporcionarán información valiosa sobre la dosis óptima y la eficacia del bioinsumo en la inhibición del crecimiento fúngico.

La diálisis es una técnica efectiva para concentrar enzimas al eliminar impurezas y solventes de bajo peso molecular. Se sugiere implementar este proceso utilizando membranas semipermeables que permitan el paso de moléculas pequeñas, pero retengan la catalasa. La diálisis puede realizarse en sistemas de flujo continuo para aumentar la concentración de la enzima de manera eficiente. Este proceso mejora la pureza y concentración del bioinsumo, aumentando su eficacia en los tratamientos postcosecha.

Se sugiere la utilización de sustratos y residuos agroindustriales como cáscaras de frutas y residuos de cultivos. Estos materiales pueden actuar como fuentes de carbono y nitrógeno, esenciales para la actividad enzimática. La incorporación de estos sustratos puede mejorar la estabilidad y eficiencia de la catalasa al proporcionar un entorno rico en nutrientes que favorece la actividad enzimática. Además, el uso de residuos agroindustriales contribuye a la sostenibilidad del proceso al reducir los desechos y costos de producción.

Para conservar el bioinsumo enzimático a partir de catalasa, es crucial mantenerlo en una cadena de frío constante entre 2°C y 8°C, utilizando refrigeradores especializados y contenedores isotérmicos durante el transporte. Además, se deben emplear envases opacos y herméticos para

protegerlo de la luz y la humedad, y almacenarlo en soluciones buffer que mantengan un pH óptimo alrededor de 7.0. Es esencial realizar pruebas periódicas de actividad enzimática y mantener un registro detallado de las condiciones de almacenamiento

El costo de producción por kilogramo de enzima es de \$37.01 es un costo moderado para los valores referenciales enzimáticos, los costos de cada equipo fueron tomados de manufacturas con un costo público al cliente y el costo estimado de envío a Ecuador, el valor es muy optimo, considerando que el margen bruto para enzimas puede superar el 90%, el margen que se consideró para la planta es de 43.06%, dependiendo de la pureza y estándares de producción se podría considerar el incremento del margen bruto lo cual traería mayor ingresos a la planta de producción.

Referencias

- Abdelshafy, A. M., Neetoo, H., & Al-Asmari, F. (2024). Antimicrobial Activity of Hydrogen Peroxide for Application in Food Safety and COVID-19 Mitigation: An Updated Review. *Journal of Food Protection*, 87(7), 100306. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100306>
- Ajila, J. P. L., Aguilar, M. A. E., Romero, H. R. C., & Campoverde, J. Q. (2023). Análisis de la producción y comercialización de banano en la provincia de El Oro en el periodo 2018-2022. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 7494–7507. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4981
- Aruldoss, V., & Kalaichelvan, P. T. (2014). *Production of Catalase by Solid State Fermentation Using Different Agro and Fruit Peel Wastes as Substrates*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Production-of-Catalase-by-Solid-State-Fermentation-Aruldoss-Kalaichelvan/86889cd7db10ff8174495c6763cdab04866b71ae#related-papers>
- Avram, I., Gatea, F., & Vamanu, E. (2022). Functional Compounds from Banana Peel Used to Decrease Oxidative Stress Effects. *Processes*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pr10020248>
- PRO-ECUADOR. (2024). *Banano incrementa sus exportaciones al cierre del 2023*. Retrieved May 28, 2024, from <https://www.proecuador.gob.ec/banano-incrementa-sus-exportaciones-al-cierre-del-2023/>
- Baskar, R., Shrisakthi, S., Sathyapriya, B., Shyampriya, R., Nithya, R., & Poongodi, P. (2011). Antioxidant Potential of Peel Extracts of Banana Varieties (*Musa sapientum*). *Food and Nutrition Sciences*, 2(10), Article 10. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.210151>
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
- ESPAC. (2019). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria. Boletín Técnico. Retrieved June 1, 2024, from https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Boletin%20Tecnico%20ESPAC_2019.pdf
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Carpi, G., & Galassi, S. (2000). Effects of high hydrostatic pressure

- processing and of glucose oxidase-catalase addition on the color stability and sensorial score of grape juice / Efectos del tratamiento con altas presiones y de la adición de glucosa oxidasa-catalasa en la estabilidad del color y en la evaluación sensorial del zumo de uva. *Food Science and Technology International*, 6(1), 17–23. <https://doi.org/10.1177/108201320000600103>
- Merck. (2024). *Catalase from bovine liver lyophilized powder, 2,000-5,000 units/mg protein* Retrieved August 25, 2024, from <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/product/sigma/c9322>
- Cenobio-Galindo, A. de J., Hernández-Fuentes, A. D., González-Lemus, U., Zaldívar-Ortega, A. K., González-Montiel, L., Madariaga-Navarrete, A., & Hernández-Soto, I. (2024). Biofungicides Based on Plant Extracts: On the Road to Organic Farming. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms25136879>
- Chen, L.-L., Shan, W., Cai, D.-L., Chen, J.-Y., Lu, W.-J., Su, X.-G., & Kuang, J.-F. (2021). Postharvest application of glycine betaine ameliorates chilling injury in cold-stored banana fruit by enhancing antioxidant system. *Scientia Horticulturae*, 287, 110264. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110264>
- Choez Guaranda, I. A. (2018). *Determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de hojas de vernonanthura patens (kunth) h. Rob* [bachelorThesis, Espol]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/47019>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). *Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.”* 2.
- de Menezes, L. H. S., Oliveira, P. C., do Espírito Santo, E. L., Gonçalves, M. S., Bilal, M., Ruiz, H. A., da Silva, E. G. P., Salay, L. C., de Oliveira, J. R., & Franco, M. (2024). Solid-State Fermentation as a Green Technology for Biomass Valorization: Optimization Techniques for Bioprocess—An Overview. *BioEnergy Research*, 17(1), 42–58. <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10670-y>
- de Siqueira Oliveira, L., Eça, K. S., de Aquino, A. C., & Vasconcelos, L. B. (2018). Hydrogen Peroxide (H₂O₂) for Postharvest Fruit and Vegetable Disinfection. In M. W. Siddiqui (Ed.), *Postharvest*

- Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 91–99). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00004-2>
- Fang, Y., & Wakisaka, M. (2021). A Review on the Modified Atmosphere Preservation of Fruits and Vegetables with Cutting-Edge Technologies. *Agriculture*, *11*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/agriculture11100992>
- FAO. (2005). *COMITÉ DE PROBLEMAS DE PRODUCTOS BÁSICOS*. Retrieved May 28, 2024, from <https://www.fao.org/4/j5778s/j5778s.htm>
- Ferreira, R., & Petrides, D. (2020). *Industrial Enzymes Production—Process Modeling and Techno-Economic Assessment (TEA) using SuperPro Designer*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19188.09604>
- Gong, Z., Zhang, S., & Liu, J. (2023). Recent Advances in Chitin Biosynthesis Associated with the Morphology and Secondary Metabolite Synthesis of Filamentous Fungi in Submerged Fermentation. *Journal of Fungi*, *9*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof9020205>
- Hadwan, M. H., Hussein, M. J., Mohammed, R. M., Hadwan, A. M., Saad Al-Kawaz, H., Al-Obaidy, S. S. M., & Al Talebi, Z. A. (2024). An improved method for measuring catalase activity in biological samples. *Biology Methods and Protocols*, *9*(1), bpae015. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpae015>
- Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., & Foulkes, N. S. (2024). Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants*, *13*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>
- Ministerio del comercio exterior (2017). *Informe sector bananero español*. Retrieved May 28, 2024, from <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/Informe-sector-bananero-espa%C3%B1ol-04dic17.pdf>
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kriem, L. S., Pietzka, C., Beckett, M., Gärtling, L., & Wriedt, B. (2023). Electrochemical In Situ Hydrogen

- Peroxide Production Can Reduce Microbial Load in Bioponic Nutrient Solutions Derived from Organic Waste. *Agriculture*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture13112122>
- Książek, E. (2024). Citric Acid: Properties, Microbial Production, and Applications in Industries. *Molecules*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/molecules29010022>
- León Serrano, L. A., Arcaya Sisalima, M. F., Barbotó Velásquez, N. A., Bermeo Pineda, Y. L., León Serrano, L. A., Arcaya Sisalima, M. F., Barbotó Velásquez, N. A., & Bermeo Pineda, Y. L. (2020). Ecuador: Análisis comparativo de las Exportaciones de banano orgánico y convencional e incidencia en la Balanza Comercial, 2018. *Revista Científica y Tecnológica UPSE (RCTU)*, 7(2), 38–46. <https://doi.org/10.26423/rctu.v7i2.521>
- NOVOPRO (2020). Retrieved June 17, 2024, from <https://www.novoprolabs.com/tools/buffer-preparations-and-recipes/m9-minimal-medium-buffer>
- Mahmud, M., Naziri, M. I., Yacob, N., Talip, N., & Abdullah, Z. (2014). Degradation of chitosan by gamma ray with presence of hydrogen peroxide. *AIP Conference Proceedings*, 1584(1), 136–140. <https://doi.org/10.1063/1.4866119>
- Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. *Antioxidants*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>
- Moncayo, D., Buitrago, G., & Algecira, N. (2013). The surface properties of biopolymer-coated fruit: A review. *Ingeniería e Investigación*, 33(3), 11–16.
- Nutrition, C. for F. S. and A. (2023, October 16). *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. FDA; FDA. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
- Oiza, N., Moral-Vico, J., Sánchez, A., Oviedo, E. R., & Gea, T. (2022). Solid-State Fermentation from Organic Wastes: A New Generation of Bioproducts. *Processes*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/pr10122675>
- Padilha da Silva, W., Lopes, G. V., Ramires, T., & Kleinubing, N. R. (2024). May phenolics mitigate the antimicrobial resistance in foodborne pathogens? *Current Opinion in Food Science*, 55, 101107.

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101107>

Panchez, R., Saquinaula, J., López, J., Cabal, A., & Vera, D. (2021). Análisis en Procesos de Producción del Sector Bananero de acuerdo a la Norma Sostenible RAS e ISO (14001-9001) durante la emergencia sanitaria Covid-19. *Ecuadorian Science Journal*, 5(Extra-4), 42–60.

Paredes-Lopez, O., González-Castañeda, J., & Cárabez-Trejo, A. (1991). Influence of solid substrate fermentation on the chemical composition of chickpea. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, 58–62. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90304-Y](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90304-Y)

Patel, N., & Vora, N. C. (2022). STUDY OF ACTIVITY OF CATALASE ENZYME IN VARIOUS FRUITS. *International Association of Biologicals and Computational Digest*, 1(2), 216–221. <https://doi.org/10.56588/iabcd.v1i2.72>

Péra, T. G., Rocha, F. V. da, & Caixeta Filho, J. V. (2023). Tracking Food Supply Chain Postharvest Losses on a Global Scale: The Development of the Postharvest Loss Information System. *Agriculture*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101990>

Piotrowska-Długosz, A. (2019). Significance of Enzymes and Their Application in Agriculture. In Q. Husain & M. F. Ullah (Eds.), *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications* (pp. 277–308). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25023-2_14

CBSE Chemistry Practicals Class 12. (n.d.). *Preparation of Ferrous Ammonium Sulphate (Mohr's Salt)* BYJUS. Retrieved July 7, 2024, from <https://byjus.com/chemistry/preparation-of-ferrous-ammonium-sulphate/>

Razaq, A. (2020). *Catalase Enzyme role in Drug and Food industry*. 8(7).

Roibás, L., Elbehri, A., & Hospido, A. (2016). Carbon footprint along the Ecuadorian banana supply chain: Methodological improvements and calculation tool. *Journal of Cleaner Production*, 112, 2441–2451. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.074>

Salgado-Escobar, I., Hernández-Rodríguez, G., Suárez-López, Y. del C., Mancera-Ugarte, M. J., Guerra-Ramírez, D., Salgado-Escobar, I., Hernández-Rodríguez, G., Suárez-López, Y. del C., Mancera-Ugarte, M. J., & Guerra-Ramírez, D. (2020). Eficacia de métodos de desinfección y los efectos sobre

- las propiedades nutraceuticas en cilantro y fresa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(2), 327–337. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.1892>
- Santillán, L. F. J., García, S. A. L., & Benito, H. E. (2023). Uso de peróxido de hidrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 9452–9461. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.5151
- Shehata, S. A., Abdelrahman, S. Z., Megahed, M. M. A., Abdeldaym, E. A., El-Mogy, M. M., & Abdelgawad, K. F. (2021). Extending Shelf Life and Maintaining Quality of Tomato Fruit by Calcium Chloride, Hydrogen Peroxide, Chitosan, and Ozonated Water. *Horticulturae*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7090309>
- Shinkawa, S., & Mitsuzawa, S. (2020). Feasibility study of on-site solid-state enzyme production by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1669-3>
- Sugianti, C., Imaizumi, T., Thammawong, M., & Nakano, K. (2022). Recent Postharvest Technologies in the Banana Supply Chain. *Reviews in Agricultural Science*, 10(0), 123–137. https://doi.org/10.7831/ras.10.0_123
- Suseno, N., Savitri, E., Sapei, L., & Padmawijaya, K. S. (2014). Improving Shelf-life of Cavendish Banana Using Chitosan Edible Coating. *Procedia Chemistry*, 9, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.014>
- Thakur, R., Pristijono, P., Bowyer, M., Singh, S. P., Scarlett, C. J., Stathopoulos, C. E., & Vuong, Q. V. (2019). A starch edible surface coating delays banana fruit ripening. *LWT*, 100, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.055>
- Ungureanu, C., Tihan, G., Zgârian, R., & Pandelea (Voicu), G. (2023). Bio-Coatings for Preservation of Fresh Fruits and Vegetables. *Coatings*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/coatings13081420>
- Wang, Z., Pu, H., Shan, S., Zhang, P., Li, J., Song, H., & Xu, X. (2021). Melatonin enhanced chilling tolerance and alleviated peel browning of banana fruit under low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 179, 111571. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111571>
- Zarbaksh, S., Shahsavari, A. R., Afaghi, A., & Hasanuzzaman, M. (2024). Predicting and optimizing reactive

oxygen species metabolism in *Punica granatum* L. through machine learning: Role of exogenous GABA on antioxidant enzyme activity under drought and salinity stress. *BMC Plant Biology*, 24(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04740-2>

Zou, F., Tan, C., Zhang, B., Wu, W., & Shang, N. (2022). The Valorization of Banana By-Products: Nutritional Composition, Bioactivities, Applications, and Future Development. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203170>