

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



“Obtención y establecimiento de las condiciones de un inhibidor del oscurecimiento enzimático del aguacate Hass (Persea americana var. Mill) a partir de la semilla del mismo para su uso en fresco”.

Por:

José Juan Buenrostro Figueroa

Tesis

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

ING. EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Agosto de 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Obtención y establecimiento de las condiciones de un inhibidor del oscurecimiento enzimático del aguacate Hass (Persea americana var. Mill) a partir de la semilla del mismo para su uso en fresco”.

Presentado por:

JOSÉ JUAN BUENROSTRO FIGUEROA

TESIS

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito

Parcial Para Obtener el Título de:

ING. EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobado

Asesor Principal

Vocal

M.C. María Hernández González

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal

Vocal Suplente

M.P. Francisco Hernández Centeno

M.C. Haydeé Yajaira López De la Peña

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Ing. José Rodolfo Peña Oranday

AGRADECIMIENTOS

“El recuerdo que deja un libro es más importante que el libro mismo.”

Gustavo Adolfo Bécquer (1836-1870) Poeta español.

*A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, **mi Alma Mater**, por haberme recogido en su seno y brindarme la oportunidad de cumplir una de mis metas propuestas para ser alguien en la vida y luchar por ello.*

*Al **Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, así como a todo el personal y profesores que lo integran, por sus atenciones y el interés mostrados a lo largo de toda mi formación y el desarrollo de la presente investigación, mil gracias.*

*A la **M.C. María Hernández González**, por brindarme esa oportunidad de ser parte de ese equipo de trabajo formado en esta investigación, por compartir conmigo una parte del conocimiento tan amplio que posee, mil gracias por todo el tiempo dedicado en la presente investigación, por sus consejos y sugerencias, pero sobre todo por la amistad brindada a lo largo de la carrera.*

*A la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por compartir parte de sus conocimientos y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de la presente tesis, y sobre todo por aceptar ser parte de este trabajo de investigación.*

*Al **M.P. Francisco Hernández Centeno**, por su apoyo brindado y sobre todo por su amistad y hospitalidad brindada desde que llegué a mi alma mater, gracias Paco.*

*A la **M.C. Haydeé Yajaira López De la Peña**, por aceptar formar parte de esta investigación.*

*Al **M.C. Oscar Noé Reboloso Padilla** y a la **M.C. Xóchitl Ruelas Chacón**; por el esfuerzo realizado no sólo con mi persona sino con todos mis compañeros, para contribuir a nuestra formación como profesionistas para que mis compañeros y yo tuviéramos una*

formación como profesionistas, por el apoyo brindado y sobre todo por aguantar esta VII generación tan especial.

Al Dr. Heliodoro Octavio De la Garza Toledo, el padrino por compartir parte de sus conocimientos y por todo el apoyo brindado y tantos momentos que compartió con la popubanda.

Al M.C. Gerardo Sánchez, por ser mi amigo y compartir su conocimiento, por los buenos tiempos vividos, por todos sus consejos, muchas gracias brother.

A la M.C. Mildred Inna Flores Verástegui, el T.L.Q Carlos Arévalo, a la T.L.Q. María Guadalupe Pérez Ovalle; por estar siempre dispuestos a apoyarme con el equipo y reactivos requeridos en la realización de esta investigación, mil gracias.

A toda la Popubanda de Alimentos: Emilio (Mi funda), Romeo (mi vieja o naricienta), Mi carnal el Pollo Chilango, Tafolla (Hércules de llavero), Barrabas, Omar (Wiris), Virgilio (la otra), De Olarte, Odi, Gaspar, Chuy (Oaxs), Villada, Hugo (me lo shingo como no), Toulouse, Memo (no sé!), y a mis compañeras Iris, Dodanys, Lusvia, Magaly, Caro, Brenda, Paula, Lisbeth, Gisela, Aricelda y Bety.

A todos ellos mil gracias ya que de alguna manera en todo el tiempo convivido con ellos me ayudaron a olvidarme de la distancia, llegando a formar parte de mi vida siendo parte de la gran familia que hice en mi estancia en la escuela, gracias por todos los buenos y también por los malos momentos que pasamos, me llevó un recuerdo de cada unos de ustedes, una sonrisa que se graba en mi mente, mil gracias.

A mis amigos: El Inge Dedos, Tirado, el sombra, Chiter, Rosy, Wicho, Gama (el alcohol), Rosalío (Chalys), Viño, Juan De Dios (Burro), al Pantro, a mi cuata Azucena, Pinky, Benito, Michel, Quevedo, el primo, Dora Elia, Jesús Frías, Rodo, Poncho (Bigotes); en fin a todos aquellos forman parte de mi vida, gracias por todo.

DEDICATORIAS

A Dios Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres:

Sra. Rosa María Figueroa López

Sr. Juan Buenrostro Primo

Por creer en mí, por ser más de lo que les pedí y de lo que en algunas ocasiones merecía. Por brindarme todo lo que me hizo falta antes de que lo notara, antes de que lo pidiera, por dar más de lo que necesite. Por sus consejos basados en su experiencia y enseñarme el valor de prever, por la paciencia que tantas veces he necesitado. Pero principalmente les agradezco por confiar en mi y haberme dejado ser, por esas noches en vela que pasaron junto a mi cuando los necesitaba, Junto a ustedes aprendí que soy exactamente lo que siempre he querido ser, mi respeto y admiración, los amo.

*A mis hermanas: **Miriam, Sonia y Lulú**, por que siempre he contado con ellas para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad ¡Gracias!.*

*A todos mis **primos, sobrinos, tíos** y demás, me resulta muy difícil poder nombrarlos en tan poco espacio, sin embargo ustedes saben quienes son.*

*A ti **Vicky**, por ser quien eres y haberme dado esos buenos y malos momentos, pero sobre todo por traer esa estrella a mi vida: **Toñito**, ya que su llegada cambió mi vida, mil gracias.*

A todos los miembros de la “Popubanda de ICTA” Que gracias al equipo que formamos logramos llegar hasta el final del camino y comprender que el que se ríe se lleva....y el que se lleva se aguanta!!!ç

*Al **Q.F.B. Manuel Hernández**, ya que sus enseñanzas fueron el pilar para hacer hecho realidad este sueño, por su amistad y apoyo, mil gracias maestro.*

*A **Sandra Belem Barraza Chavira**, llegaste cuando menos te esperaba, no sé que hubiera pasado si no hubiera ido a jugar ese día al Parque Madero. Por tu sinceridad, amistad y comprensión, por tu apoyo en los momentos de presión haciéndome disipar la carga y ocasionando que el trabajo fuera más placentero. Por que tu forma de ser, por permitirme estar a tu lado, nunca cambies, mil gracias...*

Y a Ti por haber aparecido y cambiado mi vida.

Gracias a todos!!!

El éxito se alcanza sólo cuando se tiene con quien compartirlo

Gracias por ayudarme a lograrlo.

Los quiero mucho

José Juan Buenrostro Figueroa

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 HIPÓTESIS.....	4
1.4 OBJETIVOS.....	4
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPITULO 2	
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.2 <i>ORIGEN DEL AGUACATE</i>	5
2.2.1 <i>EL FRUTO DEL AGUACATE</i>	6
2.2.2 <i>HISTORIA DEL AGUACATE EN MEXICO</i>	7
2.2.3 <i>IMPORTANCIA SOCIOECONOMICA</i>	8
2.2.3.1 <i>IMPORTANCIA ECONÓMICA</i>	9
2.2.4 <i>PRODUCCIÓN</i>	9

2.2.4.1	PRODUCCIÓN INTERNACIONAL.....	9
2.2.4.2	PAÍSES IMPORTADORES.....	10
2.2.4.3	PRODUCCION NACIONAL.....	11
2.2.5	USOS Y BENEFICIOS.....	11
2.2.6	EL AGUACATE EN LA SALUD HUMANA.....	13
2.2.7	CONSERVACIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN DEL AGUACATE.....	15
2.2.8	DESVENTAJAS.....	16
2.3	OSCURECIMIENTO EN ALIMENTOS.....	17
2.3.1	OSCURECIMIENTO NO ENZIMÁTICO DE ALIMENTOS. .	18
2.3.2	OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO.....	18
2.4	ENZIMA POLIFENOLOXIDASA.....	20
2.4.1	CARACTERÍSTICAS DE LA PPO.....	22
2.4.2	ALTERNATIVAS PARA SU INHIBICIÓN.....	23
2.4.2.1	MÉTODOS QUÍMICOS.....	23
2.4.2.2	MÉTODOS ENZIMÁTICOS.....	24
2.4.2.3	MÉTODOS GASEOSOS.....	25
2.4.2.4	TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	26
2.4.2.5	PELÍCULAS COMESTIBLES.....	26
2.4.2.6	TECNOLOGÍAS EMERGENTES.....	27
2.5	EL COLOR EN LOS ALIMENTOS.....	28
2.5.1	EL ESPACIO DE COLOR $L^*a^*b^*$	29
CAPÍTULO 3		
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1.1	ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	32

3.1.2 LOCALIZACIÓN.	32
3.1.3 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO.	33
3.1.3.1 MATERIALES	33
3.1.3.2 EQUIPOS DE LABORATORIO.....	34
3.1.3.3 REACTIVOS.....	34
3.1.4 MATERIAL VEGETAL.....	35
3.1.5 ETAPA 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD INHIBITORIA A PARTIR DE LA SEMILLA DEL AGUACATE.....	36
3.1.5.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA. .	37
3.1.6 ETAPA 2: EVALUAR EL EFECTO INHIBITORIO PRODUCIDO POR EL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE AGUACATE.....	38
3.1.6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
3.1.6.2 MONTADO DEL EXPERIMENTO.....	38
3.1.7 ETAPA 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS. . .	38
 CAPÍTULO 4	
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
4.1.1 ETAPA 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD INHIBITORIA A PARTIR DE LA SEMILLA DEL AGUACATE.....	40
4.1.2 ETAPA 2. ANÁLISIS MULTIVARIADO.....	41
4.1.3 ETAPA 3. VARIANZA EN L.....	45
4.1.3.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBIDOR EN FUNCIÓN A LA LUMINOSIDAD (L*).	47
4.1.3.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN VS. EL TIEMPO EN FUNCIÓN A LA LUMINOSIDAD (L*).	48

CAPÍTULO 5	
5.1 CONCLUSIONES.	53
CAPÍTULO 6	
6.1 PERSPECTIVAS ACERCA DE ESTA INVESTIGACIÓN.	55
CAPÍTULO 7	
7.1 APÉNDICE.	56
CAPITULO 8	
8.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	64

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
TABLA 1: PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE AGUACATE. . . .	10
TABLA 2. ANÁLISIS DE 100 G DE PULPA DE AGUACATE HASS.	14
TABLA 3. MATERIALES UTILIZADOS.	33
TABLA 4. EQUIPOS UTILIZADOS.	34
TABLA 5. REACTIVOS EMPLEADOS.	34
TABLA 6. CONTENIDO DE PROTEÍNA DEL EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE SEMILLA DE AGUACATE.	41
TABLA 7. CORRELACIONES ENTRE L*A*B*.	42
TABLA 8. PARÁMETROS L*A*B* EN AGUACATE HASS.	43
TABLA 9. VALORES OBTENIDOS EN LA ESCALA L*A*B*.	43
TABLA 10. DIFERENCIAS ENTRE T ₀ Y Tf.	49
TABLA 11. INHIBICIÓN EN LA EXPRESIÓN DE PPO EN RELACIÓN A L*.	50
TABLA 5. ANÁLISIS T-STUDENT EN CONCENTRACIÓN.	61
TABLA 6. ANÁLISIS T-STUDENT CONCENTRACIÓN VS. TIEMPO EN FUNCIÓN A L.	61
TABLA 14. INHIBICIÓN EN LA EXPRESIÓN DE PPO EN RELACIÓN A*.	63
TABLA 15. INHIBICIÓN EN LA EXPRESIÓN DE PPO EN RELACIÓN A B*.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
FIGURA 1. IMAGEN DEL AGUACATE.	7
FIGURA 2. REACCIONES CATALIZADAS POR PFO.	21
FIGURA 3. SÓLIDO DE COLORES PARA EL ESPACIO L*A*B*.	30
FIGURA 4. DIAGRAMA DE CROMATICIDAD DE A*, B*.	31
FIGURA 5. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO.	35
FIGURA 6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD INHIBITORIA.	37
FIGURA 7. DIAGRAMA DE CROMATICIDAD.	44
FIGURA 8. GRADO DE INHIBICIÓN DE DIFERENTES [PROTEÍNA] SOBRE L*.	46
FIGURA 9. CAMBIOS EN LA LUMINOSIDAD (L).	47
FIGURA 10. CURVA PATRÓN.	56
FIGURA 11. TESTIGO.	57
FIGURA 12. TRATAMIENTO 0.025%.	57
FIGURA 13. TRATAMIENTO 0.05%.	58
FIGURA 14. TRATAMIENTO 0.1%.	58
FIGURA 15. TRATAMIENTO 0.15%.	59
FIGURA 16. TRATAMIENTO 0.2%.	59
FIGURA 17. GRADO DE INHIBICIÓN DE DIFERENTES [PROTEÍNA] SOBRE A*.	60
FIGURA 18. GRADO DE INHIBICIÓN DE DIFERENTES [PROTEÍNA] SOBRE B*.	60

RESUMEN

El aguacate Hass (*Persea americana* var. Mill), es uno de los frutos más apreciados nacional e internacionalmente por su contenido nutricional, pues posee una gran riqueza en grasas, proteínas, vitaminas y otros componentes. Sin embargo sufre deterioro debido a reacciones de tipo bioquímico como el oscurecimiento o pardeamiento enzimático, el cual es causado por una enzima llamada polifenol oxidasa (PFO, EC 1.14.18.1).

En la actualidad se pueden aplicar gran diversidad de métodos para inhibir dicho proceso, como son el uso de agentes químicos, tratamientos térmicos, películas comestibles, inclusive las tecnologías emergentes como los pulsos luminosos; sin embargo, todos ellos alteran las propiedades nutritivas y organolépticas del producto, por lo que la búsqueda de nuevos métodos de conservación que permitan mantener la integridad de los alimentos lo más naturalmente posible es reto vigente.

Para el presente trabajo se utilizaron semillas de aguacate Hass, las cuales fueron sometidas a un proceso de extracción de la fracción proteica, mediante precipitación por contacto con solventes y centrifugación en frío. El producto obtenido se resuspendió en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.6 y se aplicó en concentraciones de 0, 0.025, 0.050, 0.100, 0.150, 0.200, 0.250 % (peso/peso) en muestras de pulpa de aguacate Hass, que luego fueron expuestas al ambiente y se evaluó el color mediante el uso de colorímetro LAB, a intervalos de 30 minutos durante 6 horas.

Se aplicó un análisis multivariado de 3 niveles, tomando a la pendiente como indicador para obtener el grado de expresión de la PFO, con lo que se calculó el % de inhibición de la misma a través de los diferentes tratamientos. La máxima inhibición se logró con la concentración de 0.200%, en un 63.83%, esta concentración presenta ligeras variaciones, las cuales no son estadísticamente

significativas ($p \leq 0.05$), hasta el tiempo de 180 min, manteniendo estable la pasta por un periodo de hasta 3 hrs, sin alterar su textura original, lo cual es 6 veces mayor al control sin adición.

PALABRAS CLAVE: Aguacate, inhibición, oscurecimiento enzimático, polifenol oxidasa.

ABSTRACT

The avocado Hass (*Persea americana var. Mill*) is one of the most valued fruits both in national and international markets, since its nutritional content, having a great amount of oils, proteins, vitamins and other compounds. Despite that it's exposed to damage regarding to biochemical reactions such as enzymatic browning, which is catalyzed by an enzyme called polyphenol oxidase (PPO. EC 1.14.18.1).

Nowadays there is a great diversity of methods to inhibit such process, including the use of chemical reagents, thermal treatments, the application of edible films, even the use of emerging technologies, as light pulses; despite that, all those methods have the disadvantage of alter the nutritional and organoleptic product's properties, that is why the search of new conservation methods allowing to keep the food's integrity in a natural way, has become the greatest challenge of the food industry.

To carry out this assay avocado's seeds were exposed to a protein fraction extraction, by precipitation using solvents and cold centrifugation. The product obtained was solved in phosphate buffer 0.1 M pH 6.8 which was applied to fresh avocado pulp at concentrations of 0, 0.025, 0.050, 0.100, 0.150, 0.200, 0.250% w/w, which were exposed to ambient conditions and monitored during 6 hrs., at intervals of 30 min. based on color by using the LAB color meter.

A multi varied analysis was carried out at three levels, considering the slope as indicator to get the PFO expression degree, calculating the inhibition percentage obtained with the different treatments; it was possible to state that the greatest inhibition was of 63.84% with a concentration of 0.200%, using this concentration non significant changes are shown until 180 min. exposition; making

possible avocado's pulp stability for 3 hrs. without original texture modification, 6 times higher than control sample without treatment.

KEY WORDS: Avocado, conservation, enzymatic browning, inhibition, polyphenol oxidase.



CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

El aguacate Hass (*Persea americana*, Var. Mill) deriva de la palabra nativa “*aoacatl*” o “*ahuacatl*” conocido también con otros nombres típicos de las regiones de origen. La planta es originaria de México y de ahí se ha expandido a otros lugares. La producción en nuestro país se distribuye en siete estados principalmente. El aguacate Hass (*Persea americana*, Var. Mill) varía de otros frutos frescos en cuanto a su contenido nutricional, al poseer una inmensa riqueza en grasas, proteínas, vitaminas y otros componentes, además de un elevado valor calórico, por lo que se clasifica entre los más nutritivos (Barranco, 2003).

El aguacate Hass (*Persea americana*, Var. Mill) es un fruto muy apreciado, tanto a nivel nacional como internacional, presenta una diversidad de formas para su consumo (guacamole, congelados, sorbetes, helados y pastas). Sin embargo su consumo se ve afectado debido a que la vida de anaquel es corta a causa del deterioro que sufre por diferentes reacciones de tipo bioquímico, como es el oscurecimiento o pardeamiento enzimático, que limitan a consumirlo principalmente en fresco. Este problema es también ocasionado por malos manejos, daños, cortes, magulladuras o infecciones durante el almacenamiento y post-cosecha, y es el principal problema sin resolver en los productos frescos cortados, ya que en sí disminuye la calidad visual y nutricional (González, 2005).

Este oscurecimiento es debido a la acción de una enzima llamada polifenoloxidasa (PPO, EC 1.14.18.1), que pertenece al grupo de las oxidoreductasas y es la principal responsable de causar pardeamiento en frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Mayer, 1979).



En la actualidad se pueden aplicar una gran diversidad de métodos para inhibir el proceso de oscurecimiento enzimático, como son los *agentes químicos*, que consisten en la adición de compuestos con capacidad inhibitoria, tales como los sulfitos, el ácido ascórbico, el ácido cítrico, el 4-hexilresorcinol y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pero éstos solo actúan por periodos de tiempo muy cortos y afectan las propiedades nutritivas y organolépticas; *métodos enzimáticos*, que resultan comercialmente no viables debido al alto costo de su aplicación; *métodos gaseosos* como el uso de atmósferas modificadas, pero las frutas frescas son más sensibles a niveles altos de CO₂; *tratamientos térmicos*, que si bien en hortalizas son la solución, en las frutas como el aguacate, que su consumo es en fresco, ocasiona cambios irreversibles en las características sensoriales; el uso de *películas comestibles*, que se limitan a su uso como antimicrobiano y se aplican cubriendo la pieza ya sea entera o en rodajas; y ,en la actualidad, el uso de *tecnologías emergentes* como las altas presiones y los pulsos luminosos, que a pesar de ser una buena alternativa tienen la desventaja de ser procesos muy caros por los equipos empleados.

El color y la apariencia son el primer contacto que tiene el consumidor con un alimento, siendo el color el principal atributo de calidad a la hora de seleccionar el alimento, por lo que resulta un parámetro muy importante junto con las características sensoriales (Anónimo, 6).

Cabe mencionar que actualmente existe ya un producto, incluso patentado, que consiste en elaborar una harina estabilizada de pulpa de aguacate, y guacamole en polvo, de la marca Real Aguacate, producido por la empresa Quinasa S.A. de C.V.; donde logra conservar los nutrientes esenciales, más no la textura y el color que los caracteriza y que son tan importantes para el consumidor, por estar relacionados con los sentidos.



1.2 JUSTIFICACIÓN

El aguacate Hass (*Persea americana*, Var. *Mill*), es un fruto abundante y muy apreciado por los consumidores mexicanos. El aguacate se consume en muy variadas formas en ensaladas, sopas, guisados, postres, bebidas. Sin embargo, el consumo de este fruto se ve afectado debido a que su vida de anaquel se ve limitada, ésta es la problemática central de la industrialización del aguacate en forma de pasta o guacamole, ya que sufre un rápido oscurecimiento enzimático durante el procesamiento y almacenamiento. Debido a esto, se limita su comercialización en forma procesada ocasionando que el producto tenga que ser consumido al instante. Este problema es también causado por daños mecánicos durante el almacenamiento y la post – cosecha, que disminuyen la calidad visual y nutricional (González, 2005).

La semilla representa aproximadamente el 15% en peso del fruto (Ramos, 1999), en consecuencia se tiene que de la industrialización actual resultan más de 100,000 toneladas de semilla anualmente, mismas que son desechadas sin aprovechamiento alguno.

Es por esto que surge la idea, aunado a investigaciones anteriores (Barranco, 2003; Gallardo, 2003), de obtener un conservador de origen natural propio de la semilla del aguacate Hass (*Persea americana*, Var. *Mill*) de manera que se le dé un uso a esta parte que se considera un desecho; y se aplique a la pasta de aguacate en fresco, evitando de esta manera el oscurecimiento enzimático, sin alterar significativamente sus características organolépticas y sus propiedades nutritivas, prolongando de ésta manera su vida de anaquel y facilitando su industrialización y/o comercialización.

Es importante mencionar que para la obtención de este conservador, nuestra materia prima (semilla de aguacate) es considerada un desecho del



procesado del aguacate. Esto permite que la semilla de aguacate sea aprovechable, obteniendo de esta manera un aprovechamiento integral del fruto.

1.3 HIPÓTESIS

Es posible inhibir el oscurecimiento enzimático del aguacate Hass (*Persea americana*, *Var. Mill*) aplicando un compuesto extraído de la semilla del mismo.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Obtener un inhibidor del oscurecimiento enzimático del aguacate Hass "*Persea americana*, *Var. Mill*", a partir de la semilla del mismo, y establecer la concentración óptima para su aplicación a la pasta de aguacate en fresco.

1.4.2 Objetivos específicos

- ✓ Extraer el componente de la semilla del aguacate Hass "*Persea americana* *Var. Mill*", que presenta las propiedades antioxidantes.
- ✓ Evaluar el efecto inhibitorio producido por el extracto de la semilla de aguacate Hass "*Persea americana*, *Var. Mill*".
- ✓ Determinar la concentración óptima del extracto para la inhibición del oscurecimiento de la pasta de aguacate.



CAPÍTULO 2

2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

2.2 ORIGEN DEL AGUACATE

El nombre de aguacate (*Persea gratissima*, *Persea americana*) deriva de la palabra Náhuatl "aoacatl" o "ahuacatl" que significa testículo, por la apariencia de este fruto. Los Españoles hicieron del ahuacatl las palabras aguacata y avocado, esta última una palabra ya conocida, que designaba antiguamente a los abogados. En portugués se conoce como **Abacate**, en alemán se conoce como fruta de mantequilla.

En algunos países de Sudamérica se le conoce como **Palta** (Argentina, Chile, Uruguay, Bolivia y el Perú). La palabra Guacamole proviene del Náhuatl ahuacamolli, que significa sopa o salsa de aguacate. Los españoles mencionaron esta fruta por primera vez en 1519 en escritos. (Anónimo, 1).

A partir de pruebas arqueológicas encontradas en Tehuacán (Puebla), con una antigüedad aproximada de 12,000 años, se ha determinado concretamente que el aguacate es originario de México. En Trujillo (Perú) según recientes investigaciones, el aguacate se conoce desde hace unos 4,000 años. (Fersini, 1975).

La especie comprende tres grupos o razas ecológicamente definidas:

- ❖ **Raza mexicana:** *Persea americana* var. *drymifolia*,
- ❖ **Raza guatemalteca:** *Persea nubigena* var. *guatemalis*
- ❖ **Raza antillana:** *Persea americana* var. *americana*.



Las dos primeras son originarias de los altiplanos mexicano y guatemalteco, y la última de las tierras bajas de Centro América. Existen además híbridos antillo guatemaltecos y guatemalteco mexicanos que han dado origen a variedades y cultivares adaptados a diferentes alturas y microclimas que han hecho posible la producción de fruta durante todo el año (Anónimo, 2).

La raza mexicana se caracteriza por su gran resistencia al frío y a su alto contenido de aceite, la raza guatemalteca caracterizada por su cáscara gruesa le permite mayor resistencia al manejo y transporte y finalmente la raza antillana, la cual tiene como principal ventaja su adaptabilidad a clima tropical y su tolerancia a los suelos salinos, además de su corto periodo de floración.

El aguacate pertenece al Orden Ranales, Suborden Magnolíneas y es miembro de la numerosa Familia vegetal de las Lauráceas, que comprende poco más de 47 Géneros y cerca de 2,000 especies, de características bastante homogéneas que se encuentran en áreas tropicales y subtropicales, que son árboles perennes o arbustos con flores trímeras y regulares, cuyas hojas poseen numerosas cavidades de aceite, entre los que se encuentra el Género *Persea* -que comprende 84 especies establecidas en el trópico americano-, al cual pertenece la especie *Persea americana* Mill (Anónimo, 3).

2.2.1 EL FRUTO DEL AGUACATE

El fruto del aguacate es una drupa carnosa, de forma periforme, ovoide, globular ó elíptica alargada; El fruto consta de tres partes: corteza, pulpa y semilla. Su color varía del verde claro al verde oscuro, y del violeta al negro, como se observa en la figura 1. La forma, el color, la estructura y consistencia de la cáscara y de la pulpa, son características determinadas por el grupo ecológico y la variedad analizada, con pulpa de consistencia de carne de membrillo hasta la suave de la mantequilla, coloreada en amarillo claro al interior y verduzco hacia el exterior, casi inodoro y sabor algo parecido al de



avellana (Fersini, 1975). El peso normal de cada pieza de aguacate oscila entre los 200 y 400g, aunque los hay de mayor peso (Morales, 2000).



Figura 1. Imagen del aguacate

El fruto de aguacate está compuesto principalmente de agua. Sin embargo, del 10 a más del 30% del peso fresco del fruto corresponde a materia seca. De los distintos componentes del fruto, la pulpa y la semilla son los que contribuyen en mayor proporción al peso seco total del fruto (Salazar, 2002).

2.2.2 HISTORIA DEL AGUACATE EN MÉXICO

Hasta 1963 en México, estuvo predominando la variedad criollo selecto y los estados productores más importantes eran Puebla, Veracruz y Michoacán. A partir de esta fecha, la variedad del criollo dejó de ser importante, siendo reemplazada por variedades mejoradas, entre las cuales sobresalieron el Fuerte y el Hass. Este cambio se llevó a cabo en el estado de Michoacán, iniciándose en 1961, cuando el Instituto Mexicano del Café propició el establecimiento de diversos cultivos en el Estado, con el fin de moderar la expansión del café y proteger sus precios en el mercado internacional.



Al inicio, la variedad que más se difundió fue la Fuerte. Esta llegó a California en 1911, procedente de Atlixco, Puebla, para ser posteriormente mejorada genéticamente y propagada a nivel mundial. El aguacate Fuerte obtuvo algún tiempo una gran expansión en el estado Michoacán. Sin embargo, rápidamente fue desplazado por otra variedad mejorada, el aguacate Hass, que dadas sus excelentes características de productividad, calidad (tanto en su contenido nutricional como su presentación) y resistencia para el manejo comercial, ha llegado a ser el número uno en el estado de Michoacán y también a nivel nacional.

De 1979 en adelante, se registró un creciente proceso de concentración regional de la producción, junto con una tendencia al predominio de una sola variedad. El Hass es una variedad comercial obtenida de una rigurosa selección a partir de la variedad guatemalteca (Barranco, 2003).

2.2.3 IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA

En nuestro país, el aguacate se cultiva en varios Estados de la República, destacándose Michoacán, Nayarit, Morelos, Puebla y México. En la zona productora del Estado de Michoacán, el cultivo del aguacate es la principal actividad económica, generando una importante fuente de empleos, aunado a esto los beneficios que se origina entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores, ya que los huertos generan empleo al demandar mano de obra para podas, riegos, cuidado nutritivo y fitosanitario, cosecha, acarreo, selección, el empaque, el traslado, el mercadeo y ventas al mayoreo y menudeo.



2.2.3.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El aguacate presenta una importancia creciente en los mercados internacionales debido no sólo a las amplias posibilidades para el consumo en fresco y procesado (guacamole, congelados, sorbetes, helados) sino también a su carácter de materia prima para la extracción de aceite de amplia utilización en la industria de los cosméticos, jabones, lociones, cremas y shampoo.

La explotación comercial de este producto se ha intensificado en las últimas dos décadas principalmente con variedades e híbridos de bajo peso (200 a 350 g) como Hass, Fuerte, Nabal, Reed y Bacón que son las más apetecidas en el mercado mundial.

2.2.4 PRODUCCIÓN

2.2.4.1 PRODUCCIÓN INTERNACIONAL

El área de producción de aguacate incluye a los países de Centro y Sudamérica (Paraguay, Perú, Brasil, Chile, El Caribe, México, Colombia y Guatemala), algunas regiones de Norteamérica (Florida y California) todo el continente Africano, China, Indonesia, Filipinas, Hawai y las Canarias (Fersini, 1975), sur de España, Francia, Polinesia, Tahití e Islas Madera (Brom y Carvalho, 1966).

El aguacate es un fruto de gran importancia para México, derivado de los beneficios económicos que origina, ya que se considera a México como el principal productor a nivel mundial, tal como se indica en la tabla 1, con una producción arriba de las 800,000 toneladas anuales (Giacinti, 2002), seguido por Estados Unidos, Indonesia, Colombia, Brasil, Chile y República Dominicana, Perú, Sudáfrica, e Israel entre otros. Debido a las bondades y a la



exquisitez del fruto, el comercio internacional ha crecido considerablemente, por lo cual en varios países se puede ya disfrutar de esta deliciosa fruta.

Tabla 1: Principales países productores de aguacate

País	Toneladas (Miles)	%
México	888	43
Estados Unidos	175	9
Indonesia	128	6
Colombia	121	6
Brasil	85	4
Chile	80	4
República Dominicana	79	4
Otros	485	24
Total Mundial	2368	100

Fuente: Giacinti, 2002

La importancia del aguacate en el mercado internacional ha crecido sostenidamente, dejando de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta de muchos países, lo anterior aunado a la tendencia mundial creciente en el consumo de productos naturales. La producción mundial del aguacate se ha incrementado en 550,000 toneladas durante los últimos 15 años.

2.2.4.2 PAÍSES IMPORTADORES

El principal país importador del aguacate es Francia que absorbe el 39% de las importaciones mundiales. Otros países compradores son los E.U.A con un 10% (para redistribución), Reino Unido y Bélgica (6.5% cada uno).

Los líderes del comercio internacional del aguacate son Sudáfrica, Israel y España. Estos tres países han sido los principales exportadores desde 1993.



El comercio mundial del aguacate se ha incrementado considerablemente a partir de 1980, a pesar de que, en el caso de México, se ha limitado primordialmente a los Estados Unidos y Europa. Japón ha comenzado a importar grandes volúmenes de ese producto siendo el principal país de oriente en hacerlo.

2.2.4.3 PRODUCCIÓN NACIONAL

De los centros de origen del aguacate en el sur de México, se ha extendido a toda la República Mexicana con excepción de los estados de Chihuahua y Baja California Norte. La superficie sembrada de aguacate es de 112,782 hectáreas distribuidas en 28 estados, sin embargo, la producción se encuentra localizada principalmente en Michoacán, donde se concentra más del 80% de la producción, con una estimación para el 2006 de 963 mil 499 toneladas.

Otros estados que destacan en la producción de aguacate son Morelos, Nayarit, Puebla, Guerrero y Jalisco, con 32 mil 489, 23 mil 158, 12 mil 785, 12 mil tres y ocho mil 560 toneladas, en ese orden (SIAP, 2006).

2.2.5 USOS Y BENEFICIOS

Las diferentes culturas existentes en el mundo, han contribuido a diversificar los usos del aguacate. En Brasil lo añaden a los helados y nieves; en Japón lo comen con rollos de sushi; en Cuba lo muelen con alcaparras, olivos verdes, jugo de limón y aceite de oliva y lo sirven con pescado hervido; en Nicaragua lo rellenan con queso y lo baten, doran y hornean. En Taiwán lo comen con leche y azúcar; en Corea lo mezclan con leche para usarlo como crema para la cara y el cuerpo; en Indonesia lo mezclan con café, ron y leche para hacer una bebida refrescante; en el Caribe lo mezclan con sal de bacalao, cazave, ajo y coco y lo sirven como botana; en Filipinas lo hacen puré con



azúcar y leche para preparar una bebida que se sirve como postre (Ayala, 1998).

El aguacate se consume en muy variadas formas como ensaladas, sopas, guisados, postres, bebidas. Con respecto a lo anterior, existe un recetario, editado por la Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate de Uruapan, Michoacán, que describe los diversos usos del aguacate y los platillos que se pueden preparar con el mismo.

El aguacate se ha destacado por sus diferentes usos: medicinales, utilizando hojas, cáscaras, semillas y corteza; extracción de aceites, el cual se le compara con el aceite de oliva; y además se utiliza como materia prima en la fabricación de shampoo y cosméticos como cremas, aceites y películas protectoras y limpiadoras de la piel.

El 95% de la producción del país se consume principalmente la fruta en fresco o la pulpa procesada en forma de guacamole, situación muy favorable en la dieta del ser humano considerando el alto valor proteínico de esta fruta, y lo más importante es que no contiene colesterol.

El cultivo de aguacate es una alternativa viable para la diversificación en áreas cafetaleras, ya que puede incorporarse a la estructura productiva de la finca en asocio con el café, sirviendo de sombra para este y generando ingresos económicos en el mediano plazo.

El aceite de aguacate, por ejemplo, es tan competitivo como el aceite de oliva, por ser rico en grasas no saturadas y vitamina E, por su baja acidez y su alta composición de fitosterol, un componente similar a la lanolina, usada en la industria de cosméticos.

La semilla representa aproximadamente el 15% en peso del fruto (Ramos, 1999), en consecuencia se tiene que de la industrialización actual



resultan más de 100,000 toneladas de semilla anualmente, mismas que son desechadas sin aprovechamiento alguno.

A la semilla del aguacate se le atribuyen algunas propiedades de tipo farmacológicas debido a la presencia de ácidos grasos, compuestos polifenólicos y esteroides y ha sido usada desde muchos años atrás contra padecimientos tales como dolores musculares, parásitos y micosis (García, *et al* 1999.)

2.2.6 EL AGUACATE EN LA SALUD HUMANA

El aguacate posee propiedades benéficas a la salud (Smith *et. al*, 1983; Wills, 1986; Colquhoun, 1992), es por esto que el interés al consumo de éste es cada vez mayor, los aguacates tienen el más alto nivel de grasa monoinsaturada, vitamina E, ácido fólico, potasio, magnesio, β -sitosterol y glutatión, en comparación con otros frutos consumidos comúnmente.

Según la Food and Drug Administration (FDA) las dietas ricas en frutas y vegetales pueden reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades crónicas (Anónimo, 4). Una característica extraordinaria del aguacate es su efecto benéfico adicional al ayudar a eliminar el colesterol dañino a la salud humana (lipoproteínas de baja densidad), promover un aumento en las lipoproteínas de alta densidad, reducir el riesgo de desarrollar aterosclerosis, y mejorar las condiciones en pacientes con asma y con artritis reumatoide; además es indicado su uso en pacientes diabéticos, por su capacidad de reducción en triglicéridos y en niveles de insulina en ayuno y por su contenido de vitamina E como uno de los grandes antioxidantes aliados contra el cáncer (Anónimo, 5).

El fruto, las hojas y el hueso son utilizados en la medicina naturista para eliminar microbios y parásitos, contra la disentería y algunos desordenes



digestivos. Se dice que la energía del fruto y la combinación con las vitaminas y sales minerales le dan propiedades afrodisíacas (George, 1974).

El análisis nutricional de 100 g de pulpa de aguacate Hass se presenta a continuación en la tabla 2, que en forma cuantitativa demuestra los beneficios que proporciona el consumo de este alimento en el organismo humano.

Tabla 2. Análisis de 100 g de pulpa de aguacate Hass

Componente	Cantidad
Fibra	0.40 g
Carbohidratos	5.90 g
Proteínas	1.80 g
Grasa total	18.40 g
Ácidos grasos:	
Saturados	3 g
Monoinsaturados	8.90 g
Poliinsaturados	2 g
Retinol (A)	17.0 mg
Tiamina	0.10 mg
Riboflavina	0.10 mg
Niacina	1.80 mg
Vitamina C	15 mg
Vitamina E	1.53 mg
Vitamina B ₆	0.25 mg
Folato	10.00%
Acido pantoténico	0.87 mg
Calcio	24 mg
Hierro	0.50 mg
Magnesio	45 mg
Sodio	4 mg
Potasio	604 mg
Zinc	0.42 mg
Kilocalorías	181 Kcal

Fuente: Barranco, 2003



Investigaciones de la Ohio State University informaron que el consumo de aguacate permite que el cuerpo absorba considerablemente más nutrientes que combaten el cáncer, como el alfa caroteno, beta caroteno y el licopeno, que se encuentran en las frutas y los vegetales (Anónimo, 5).

2.3.1 CONSERVACIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN DEL AGUACATE

El aguacate es un fruto con características especiales, posee un alto valor nutritivo comparado con otros frutos frescos, mayor contenido de proteínas y grasas, y menor contenido de carbohidratos. A diferencia de otros frutos, el aguacate presenta algunas dificultades para su industrialización como puré o pasta. De hecho el consumo mundial casi en su totalidad es como un fruto fresco.

Las formas como habitualmente se prepara para su consumo son: mezclado con toronja o naranja, en ensaladas, rebanadas con sal, cócteles, en forma de puré o guacamole para emparedados y galletas saladas, y a menudo se agrega a los guisos justamente antes de servirlos.

Actualmente existe una harina estabilizada de pulpa de aguacate, elaborada por la empresa Quinasa S.A. de C.V. con el nombre de "Real Aguacate" en presentación de aguacate y guacamole en polvo, donde si bien se logran conservar los nutrientes esenciales, no se logra lo mismo en cuanto a la textura y el color que son parámetros a considerar por el consumidor a la hora de la compra.

El cocimiento del aguacate deteriora su sabor y en general sus características organolépticas.

Los aguacates se conservan y transportan a temperaturas no menores a los 4.5 °C ni superiores a los 10°C, en atmósfera con un 85% de humedad y, de



ser posible, con un porcentaje de anhídrido carbónico del 3%, superior al normal de la atmósfera. Si se conservan a temperaturas inferiores suelen sufrir alteraciones: su color cambia a pardo ó negro, y el sabor de la pulpa y su olor se vuelven desagradables.

La temperatura favorece la prolongación de la vida de los frutos, disminuyendo la velocidad con que se lleva a cabo la maduración. Para el caso del aguacate, el tiempo de almacenamiento no debe de exceder los rangos de entre 30 y 40 días, ya que los niveles de polifenoloxidasa (PFO) aumentan a medida que el almacenamiento se prolonga, haciendo a la fruta mas susceptible (Paz, 1987).

El 95% de la producción del país se consume fresco o en forma de guacamole al cual se le agrega para evitar su oscurecimiento, 200 mg de mezcla ácido ascórbico-cítrico y 30 mg de bisulfito de sodio para cada 100 gramos de guacamole.

El aceite de aguacate tiene aplicaciones industriales en la elaboración de cosméticos y como comestible sustituyendo al aceite de oliva al cual es muy parecido en su composición, si las condiciones de refinación son las adecuadas.

Considerando lo anterior, el alto contenido de aceite en el aguacate y la creciente demanda de este a nivel internacional, según la opinión expresada por profesionales que trabajan en empresas relacionadas con el área de los cosméticos, la extracción parece ser una solución a la industria eficiente de los excedentes disponibles de dicho fruto (FIRA, 1997).

2.3.2 DESVENTAJAS

El aguacate es un fruto abundante en nuestro país, no obstante, anualmente se pierden grandes cantidades debido a la presencia y desarrollo



de microorganismos, la pérdida de textura, desarrollo de aromas y sabores extraños, la desecación, el blanqueado y el oscurecimiento enzimático de la pulpa (García y Barret, 2004). Éste último es la problemática central de la industrialización del aguacate en forma de pasta o guacamole, ya que sufre un rápido oscurecimiento enzimático durante el procesamiento y almacenamiento, fenómeno de oxidación bioquímica catalizada por enzimas específicas (fenolasas o polifenoloxidasas) que están presentes en la misma pulpa (Corrales, 1991).

El consumidor de un producto mínimamente procesado espera un alimento cuyas características de apariencia, aroma, sabor y textura sean idénticas o muy próximas a las mostradas por los productos frescos. No obstante, el daño físico al que estos son sometidos durante su preparación, facilita una serie de reacciones que limitan la vida de anaquel de los mismos y contribuyen a alterar las características de calidad esperadas del producto (García y Barret, 2004).

Por consiguiente, se tiene que consumir en fresco al instante de su exposición al ambiente, además que el manejo del mismo se hace un tanto difícil; ya que requiere de un mejor manejo post-cosecha, donde se incluyen a todos los que intervienen en el proceso de producción, comercialización, industrialización y consumo (Villegas-Ochoa M, *et al.* 2005).

2.4 OSCURECIMIENTO EN ALIMENTOS

La mayoría de frutas y hortalizas se pardean después de haber sufrido algún tipo de daño, corte magulladura o infección. El pardeamiento es una de las principales causas de pérdidas en la post-recolección de los productos hortofrutícolas y es, en particular, el principal problema sin resolver en los productos frescos cortados, ya que el pardeamiento en sí disminuye la calidad visual y nutricional, además de acortar la vida útil de los mismos (González, 2005).



Sin embargo, para otros productos como té (Harbowy y Balentine, 1997) o café (Mazzaferaa y Robinson, 2000), dátiles, pasas (Grncarevic y Hawker, 1971) o cacao (Mayer y Harel, 1979; Vámos-Vigyázó, 1981), el desarrollo del oscurecimiento es necesario para que éstos productos alcancen las características sensoriales adecuadas.

Según Dominic (1989), el oscurecimiento puede ser clasificado de acuerdo a mecanismos bioquímicos como:

- ❖ Oscurecimiento no enzimático
- ❖ Oscurecimiento enzimático

2.4.1 OSCURECIMIENTO NO ENZIMÁTICO DE ALIMENTOS

El oscurecimiento no enzimático es conocido como reacción de Maillard, caramelización o formación de melanodionas. Esta última palabra designa, de forma general a los pigmentos pardos o negros resultantes de las reacciones de pardeamiento no enzimático.

Este se presenta durante los procesos tecnológicos o el almacenamiento de diversos alimentos. Se acelera por el calor y por lo tanto, durante las operaciones de cocción, pasteurización y deshidratación (Jean, 1976).

2.4.2 OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO

El oscurecimiento es uno de los problemas más importantes que se produce en las frutas y hortalizas frescas cortadas y una de las causas más importantes de su pérdida de calidad (Artés, 1998). Este deterioro tiene gran importancia por su impacto visual que perjudica la aceptación sensorial, la calidad comercial y la disminución del valor nutricional de frutas y hortalizas (Artés, 1998; McDonald y Schaschke, 2000; Sarma, 2001; Makris y Rossiter,



2002). El oscurecimiento enzimático se presenta en la superficie de corte y heridas, es causado por la acción de la enzima polifenoloxidasa (PPO) (Wong, 1971; Junquera, 1992; Lee y Whitaker, 1995; Carbonaro y Matera, 2001).

El aguacate Hass (*Persea americana*, var. Mill), es altamente susceptible al oscurecimiento enzimático, se ha reportado una fuerte relación directa entre el daño de la fruta de aguacate y la actividad de la enzima presente (Kahn, 1985).

Para que el oscurecimiento enzimático se produzca, debe haber tres componentes: polifenoloxidasa activa, oxígeno y un sustrato adecuado. La eliminación de cualquiera de estos, evitará que se produzca la reacción (Gallardo, 2003).

A pesar del nombre genérico de “pardeamiento” (“browning” en inglés), los colores formados son muy variables, marrones, rojizos o negros, dependiendo del alimento y de las condiciones del proceso. En algún caso, como en frutas secas, y la sidra, el pardeamiento enzimático contribuye al desarrollo de los colores característicos de estos productos (Calvo, 1991).

La reacción de oscurecimiento usualmente se inicia en los tejidos dañados, donde la pérdida de la compartimentación celular permite que la polifenoloxidasa y los sustratos fenólicos se mezclen (Vamos-Vigyazo, 1981).

El pardeamiento enzimático puede prevenirse, según Whitaker y Lee (1995), mediante el empleo de tratamientos combinados como son:

- ❖ Inactivación térmica de la enzima.
- ❖ Exclusión de uno o ambos sustratos de la reacción (O₂ y fenoles).
- ❖ Reducción del pH a 2 o más unidades por debajo del óptimo.
- ❖ Adición de compuestos que inhiban a la PPO o que prevengan la formación de melaninas.



2.5 ENZIMA POLIFENOLOXIDASA

La PFO es una enzima intracelular localizada en la membrana tilacoidal de cloroplastos maduros (Vaughn, 1988), en mitocondrias, microsomas o en citoplasma (Nicolas, 1994) El nivel y localización predominante en la célula depende de la especie, variedad, madurez y edad (Vámos-Vigyázó, 1981).

Este oscurecimiento es debido a la acción de una enzima llamada polifenoloxidasas (PFO, EC 1.14.18.1), que pertenece al grupo de las oxidoreductasas, y es la principal responsable de causar pardeamiento en frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Mayer, 1979).

Las polifenoloxidasas contienen Cu^{+2} como grupo prostético, el cual se reduce a Cu^{+1} para que la enzima actúe sobre los sustratos fenólicos. En tal estado, la enzima puede enlazar O_2 , produciendo la hidroxilación de monofenoles o la oxidación de difenoles a quinonas (Thygesen y col., 1995).

Esta cuproproteína, como se muestra en la Figura 2, cataliza dos tipos de reacciones acopladas en las que interviene oxígeno molecular:

- a) Hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa, cresolasa o hidroxilasa)
- b) Oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa, catecolasa u oxidasa).

Las *o*-quinonas formadas son precursores del oscurecimiento y por sí solas poseen poco color, pero se encuentran entre los compuestos intermedios más reactivos que presentan las plantas (Lee y Whitaker, 1995). Las *o*-quinonas intervienen en reacciones secundarias, dando lugar a polímeros de alto peso molecular con diversidad de coloraciones, denominados melaninas (Sánchez-Ferrer y col., 1995).

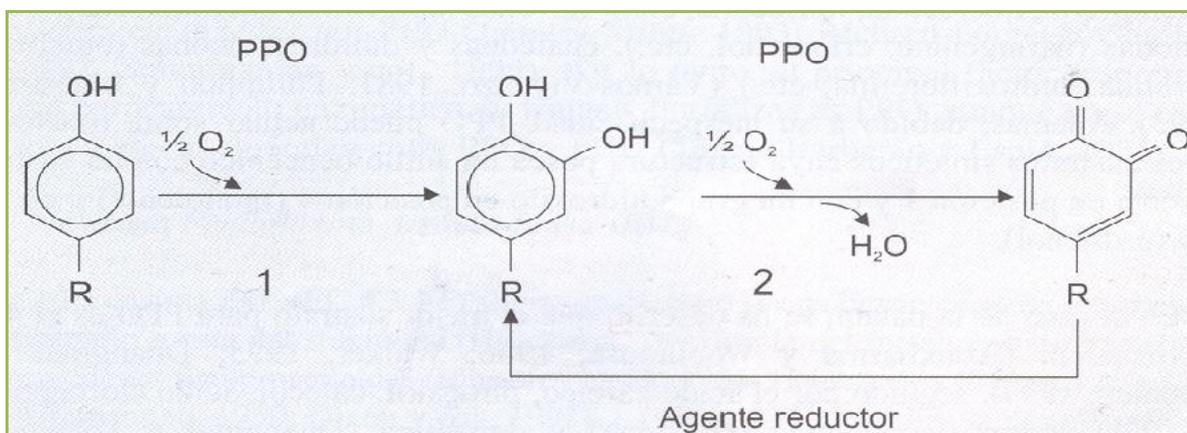


Figura 2. Reacciones catalizadas por PFO. (1) o-hidroxilación de un monofenol para originar un o-difenol (actividad monofenolasa); (2) oxidación de un o-difenol para dar lugar a una o-quinona (actividad difenolasa)

Las o-quinonas son compuestos altamente reactivos que se polimerizan no enzimáticamente dando lugar a pigmentos pardos, negros o rojos, llamados melaninas, los cuales son responsables de la pérdida de calidad visual y nutricional del producto (Tomás- Barberán y Espín, 2001). El color e intensidad de los pigmentos va a depender de los fenoles precursores y de los factores medioambientales de la reacción de oxidación (Rouet- Mayer, 1990).

La polifenoloxidasas (PFO) puede oxidar una gran variedad de substratos fenólicos para producir quinonas.

El mecanismo de oxidación medida por la polifenoloxidasas (PFO) depende principalmente de tres factores: contenido de oxígeno, tipo de sustrato y condiciones óptimas de actividad de la enzima (pH, temperatura, presencia de inhibidores, concentración de sustrato, etc.). El pH óptimo oscila entre 6 y 6.5 en presencia de un sustrato rico en compuestos fenólicos, tales como el 4-metilcatecol, ácido cafeico, pirogalol, catecol, ácido clorogénico, dopamina (3,4-dihidroxi-fenilalanina).



Aunque PFO se encuentra ampliamente distribuida en el Reino Vegetal, aún no ha podido definirse claramente su función biológica. Hasta ahora se sabe que las principales ventajas de esta enzima tienen que ver con la resistencia de las plantas frente a enfermedades (Bashan, 1985).

2.5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PFO

La enzima PFO en plantas es bastante inespecífica en su actividad, pudiendo actuar sobre una diversidad de sustratos naturales o sintéticos, (tanto *p*-monofenoles, como *o*-difenoles). Los sustratos fisiológicos más importantes encontrados en frutas y hortalizas, según especies y variedades; son: las catequinas (catequiza, epicatequina, galocatequina), derivados del ácido cinámico (ácido clorogénico, *p*-cumárico, cafeico, etc.) catecoles y derivados del ácido benzoico (ácidos protocatequico, gálico, etc.) flavonoles (kaempferol, quercetina, miricetina, etc.), flavonas (apigenina, luteolina, etc.), flavononas (naringenina, eriodictiol, etc.), chalconas y dihidrochalconas (luteína, floretina, hidroxifloretina, etc.) (Vámos-Vigyázó, 1981; Philippon y Maestre, 1993.). Además, debido a su inespecificidad, esta enzima puede actuar sobre muchos otros sustratos sintéticos cuya estructura posea un anillo bencénico con un sustituyente en posición 1 y con un grupo hidroxilo en posición 4 (monofenol) o en 3 y 4 (*o*-difenol).

La temperatura óptima para la reacción catalizada por PFO de pulpa de aguacate Hass oscila alrededor de los 30 °C. A temperaturas superiores a la anteriormente mencionada se observan decrementos en la actividad, conservando 4.23% a temperatura de 80°C llegando a un valor nulo a temperaturas superiores a 90°C (Barranco, 2003).



2.5.2 ALTERNATIVAS PARA SU INHIBICIÓN

En las dos últimas décadas han sido muy numerosas las investigaciones sobre los diferentes métodos de prevención del oscurecimiento enzimático, entre los cuales están los métodos químicos, enzimáticos, gaseosos, térmicos, el uso de películas comestibles, así como el uso de tecnologías emergentes, pero todos ellos tienen sus ventajas y sus desventajas en cuanto a su uso.

2.5.2.1 MÉTODOS QUÍMICOS

Estos se basan principalmente en la adición de compuestos con capacidad inhibitoria, tales como los sulfitos, el ácido ascórbico, el ácido cítrico, el 4-hexilresorcinol y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los sulfitos son agentes multifuncionales, ya que previenen el oscurecimiento enzimático y no enzimático, controlan el crecimiento de microorganismos y actúan como agentes blanqueantes, antioxidantes o reductores. Sin embargo, el uso de estos presenta varios inconvenientes, ya que son corrosivos; pueden degradar ciertos nutrientes y provocar ablandamiento y alteración del sabor y del aroma, así como también pueden ocasionar asma en personas alérgicas (Laurila, 1998).

El ácido ascórbico es un efectivo agente reductor de las o-quinonas a o-difenoles formadas, pero como no inhiben la acción de ésta debe ponerse una cantidad excedente, ya que cuando se agota el antioxidante y aún existe O₂ en el medio, la reacción de oscurecimiento resulta imparabile.

El ácido cítrico actúa como un agente complejante y acidulante, estas dos funciones pueden inhibir a la PFO. La combinación de ácido cítrico y ascórbico han resultado efectivas inhibiendo el pardeamiento de numerosos



productos, entre los que destacan por su potencial de oscurecimiento la manzana (Pizzocaro, 1993).

El 4-hexilresorcinol es otro de los compuestos patentados para la inhibición del oscurecimiento de muchos productos frescos cortados. Este compuesto es un inhibidor de unión lenta de PFO, inhibiendo competitivamente el desarrollo de la reacción, además es efectivo a concentraciones bajas, no blanquea los pigmentos y posee una gran estabilidad química (McEvily, 1992; Monsalve-González, 1993). Sin embargo, otras investigaciones (Nicoli, 1994; Sapers y Miller, 1998) han detectado que retarda el oscurecimiento pero no lo inhibe completamente, es por eso que se usa en combinación con otros aditivos químicos para incrementar su actividad.

Respecto a lo anterior, tal parece que no existe un único aditivo que controle el oscurecimiento como hacen los sulfitos, pero la combinación de varias sustancias pueden resultar realmente efectivos.

Un preparado de aditivos anti-oscurecimiento típico puede incluir: ácido ascórbico como agente reductor, ácido cítrico como acidulante y un agente quelante como el etilendiaminotetraacético (EDTA) (Gil MI, 2005).

2.5.2.2 MÉTODOS ENZIMÁTICOS

El uso de proteasas ha sido efectivo en el control del oscurecimiento de manzanas y peras (Taoukis, 1989; Labuza, 1992), la acción de éstas reside en la hidrólisis de la proteína enzimática responsable del oscurecimiento.

Algunas de las enzimas proteolíticas que han probado su eficacia han sido la ficina de los higos, la papaína de la papaya y la bromelina de la piña (Gil, 2005). Sin embargo, el costo tan elevado que arrojaría su aplicación las hace comercialmente no viables.



Barranco (2003) obtuvo a partir de semilla completa de aguacate Hass y de la pulpa de la misma, extractos con actividad inhibitoria sobre la enzima PPO de la pulpa de aguacate Hass.

Según estudios realizados por Gallardo (2003), al adicionar el compuesto con capacidad inhibitoria obtenido a partir de la semilla completa de aguacate Hass, observó una disminución considerable de la V_0 de la PFO extraída del aguacate Hass, logrando un 95.16 % de inhibición, el cual es un valor muy alto comparado con los resultados que arroja Barranco (2003), donde obtuvo un 82.7 % de inhibición, aplicando los inhibidores químicos más comunes (ácido cítrico, ascórbico, meta bisulfito de sodio, y una mezcla sinergista).

2.2.4.3 MÉTODOS GASEOSOS

El uso de la refrigeración es imprescindible, ya que alarga la vida útil al retardar todas las reacciones enzimáticas, pero sólo por unos días.

Una opción es el uso de atmósferas modificadas (AM), al momento del envasado, que consiste en la aplicación de bajos niveles de O_2 y altos niveles de CO_2 , respecto al aire. Se recomienda una AM con concentraciones de O_2 entre 2-5 kPa y niveles de CO_2 de 5 y 15 kPa, dependiendo del producto y procesado que se trate.

Sin embargo, las frutas frescas son más sensibles a niveles altos de CO_2 en comparación con las hortalizas, ya que presentan oscurecimiento y necrosis de los tejidos (Gorny, 1998).



2.2.4.4 TRATAMIENTOS TÉRMICOS

La enzima puede inactivarse por medio del calor. En productos como las verduras, que se cocinan posteriormente, la solución del oscurecimiento es obvia. Sin embargo, en las frutas que se comerán crudas, como el aguacate, ocasiona que experimente como consecuencia de la acción del calor, cambios irreversibles en las características sensoriales (Ortiz, 2003).

El alto contenido de grasa en la pulpa lo hace susceptible a una pérdida de color y olor, aunado a la generación de sabores amargos. El tratamiento térmico inhibe el oscurecimiento de la pulpa de aguacate *Hass*, pero este no debe ser muy severo ya que induce el sabor amargo y la decoloración, por lo que se recomienda pasteurizar a 75 °C por corto tiempo (no se especifica cuanto tiempo); además aditivos tales como ácidos orgánicos, que bajan el pH de la pulpa a menos de 6, reducen la calidad de las grasas y favorecen la decoloración sobre todo si se aplica un calentamiento al producto (Covarrubias, 1984).

2.2.4.5 PELÍCULAS COMESTIBLES

Su principal propiedad es la de limitar el contacto de la superficie del producto con el O₂ (Baldwin, 1995 y 1996). Reduciendo algunas reacciones deteriorantes. El uso de estas cubiertas en las frutas es en la mayoría de los casos como antimicrobiano, y el uso es como su nombre lo indica, cubriendo la pieza, ya sea entera o en rodajas.

Existen trabajos, como el que realizó McHugh y Senesi (2000), en donde adicionaron una mezcla de antioxidantes a recubrimientos comestibles en cascos de manzana, esta mezcla estuvo formada por los ácidos ascórbico y cítrico, además de glicerol, pectinas y cera de abeja.



Algunos de estos tratamientos presentan efectos adversos sobre las características organolépticas y nutritivas de las frutas, por lo que son necesarias nuevas formas de conservación que minimicen el impacto de estas operaciones de procesado, algunas de ellas son el uso de las tecnologías emergentes.

2.2.4.6 TECNOLOGÍAS EMERGENTES

Se han realizado diversos estudios acerca de inactivación de la PFO por altas presiones en diferentes tipos de alimentos de origen vegetal.

La estabilidad de la PFO de manzana, pera, aguacate, ciruela y también de uva ha sido determinada a pH 6-7 por Weemaes (1998). La estabilidad bajo presión varía en función de su origen. La inactivación de la PFO de manzana, uva, aguacate y pera a temperatura ambiente fue alta a 600, 700, 800 y 900 MPa respectivamente, sin embargo, la PFO de la ciruela no fue inactivada en estas condiciones, (Castellari, 1997).

Estos estudios muestran que PFO es una enzima resistente a la presión a temperatura ambiente. De acuerdo a Eshtiaghi (1994), solamente un tratamiento de 900 MPa A 45°C durante 30 minutos podría inactivar por completo la PFO de patatas en un buffer fosfato a pH 7.

De acuerdo a estudios realizados por López-Malo, Palou, Barbosa-Cánovas, Welti- Chanes, y Swanson (1999), fue posible obtener un puré de aguacate estable hecho por medio de un tratamiento de altas presiones adicionando NaCl y acidificado.

Palou (2000) aplicaron presiones de 689 MPa en 4 ciclos de 5 min cada uno, en guacamole logrando una reducción del 15% en la actividad de la PFO.



Se ha determinado que las PFO's son muy resistentes a la presión, por lo que es necesario combinarlas con tratamiento térmico moderado (Farr, 1990).

De los métodos más actuales para la conservación del aguacate está el método de ultra presión, en el cual se expone la pasta de aguacate a presiones que van alrededor de 87 000 psi (600 MPa), con lo que se eliminan todos aquellos microorganismos que pueden causar el deterioro de la pasta de aguacate, sin embargo no se reporta su efecto en el oscurecimiento enzimático (Ortiz, 2003).

El uso de tecnologías emergentes como las altas presiones hidrostáticas y de los pulsos luminosos resultan buena alternativa, pero tienen las desventajas de que son procesos muy caros por los equipos empleados, estas tecnologías son costosas y suelen utilizarse en países muy desarrollados.

2.6 EL COLOR EN LOS ALIMENTOS

El color y la apariencia son el primer contacto que tiene el consumidor con un alimento, siendo el color el principal atributo de calidad a la hora de seleccionar el alimento. El color está relacionado con las cualidades sensoriales, la composición química y, por lo tanto, uno de los factores que define la calidad de un producto alimentario (Anónimo, 6).

El estudio del color en los alimentos está tomando una gran importancia en la industria de los alimentos ya que se usan como herramienta para la automatización y control de procesos de la elaboración de diversos productos y en el control de calidad del producto terminado.

El color en los alimentos depende fundamentalmente de las transformaciones que tienen lugar sobre los pigmentos propios o adicionados a



los alimentos. Muchos de los cambios de color que ocurren durante la elaboración de los alimentos son característicos de los mismos. El seguimiento tanto de procesos de elaboración como de las alteraciones de los alimentos puede realizarse mediante la determinación del color.

La evaluación del color en los alimentos se puede realizar por métodos objetivos y subjetivos. De los métodos objetivos, el sistema CIELAB, es el que más se aproxima a la apreciación visual humana, y ha sido recomendado por diversas sociedades científicas para su uso en las mediciones del color en los alimentos (Anónimo, 7).

Los colorímetros son excelentes incluso para presentar diferencias de color mínimas. Adicionalmente, el colorímetro expresa dichas diferencias de un modo preciso en forma numérica.

Los colorímetros tienen sensibilidades que se corresponden con las del ojo humano pero, como siempre realizan mediciones utilizando la misma fuente de luz y el mismo método de iluminación, las condiciones de medición son siempre las mismas, independientemente de si es de día o de noche o de si la medición se realiza en interiores o en exteriores. Esto facilita la obtención de unas mediciones precisas (Anónimo, 8).

2.6.1 EL ESPACIO DE COLOR $L^*a^*b^*$

El espacio de color $L^*a^*b^*$ (también llamado CIELAB) es actualmente uno de los espacios más populares para medir el color de los objetos y se utiliza ampliamente en casi todos los campos (Anónimo, 8).

La Figura 3 es una representación del sólido de colores para el espacio $L^*a^*b^*$; donde se observan las escalas de colores en las que se mueve el espacio.

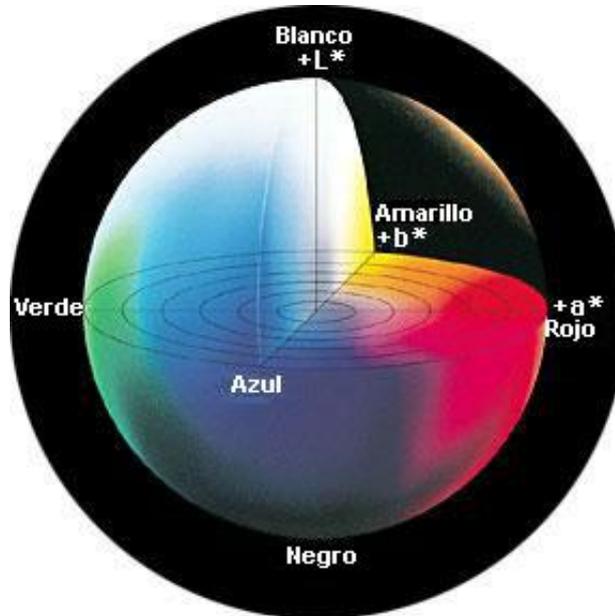


Figura 3. Sólido de colores para el espacio $L^*a^*b^*$

En este espacio, L^* indica luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad.

En la Figura 4 se muestra una vista del sólido de colores, cortado horizontalmente en un valor constante de L^* , en esta figura se aprecia claramente hacia donde se mueve cada una de las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* .



Figura 3. Sólido de colores para el espacio $L^*a^*b^*$

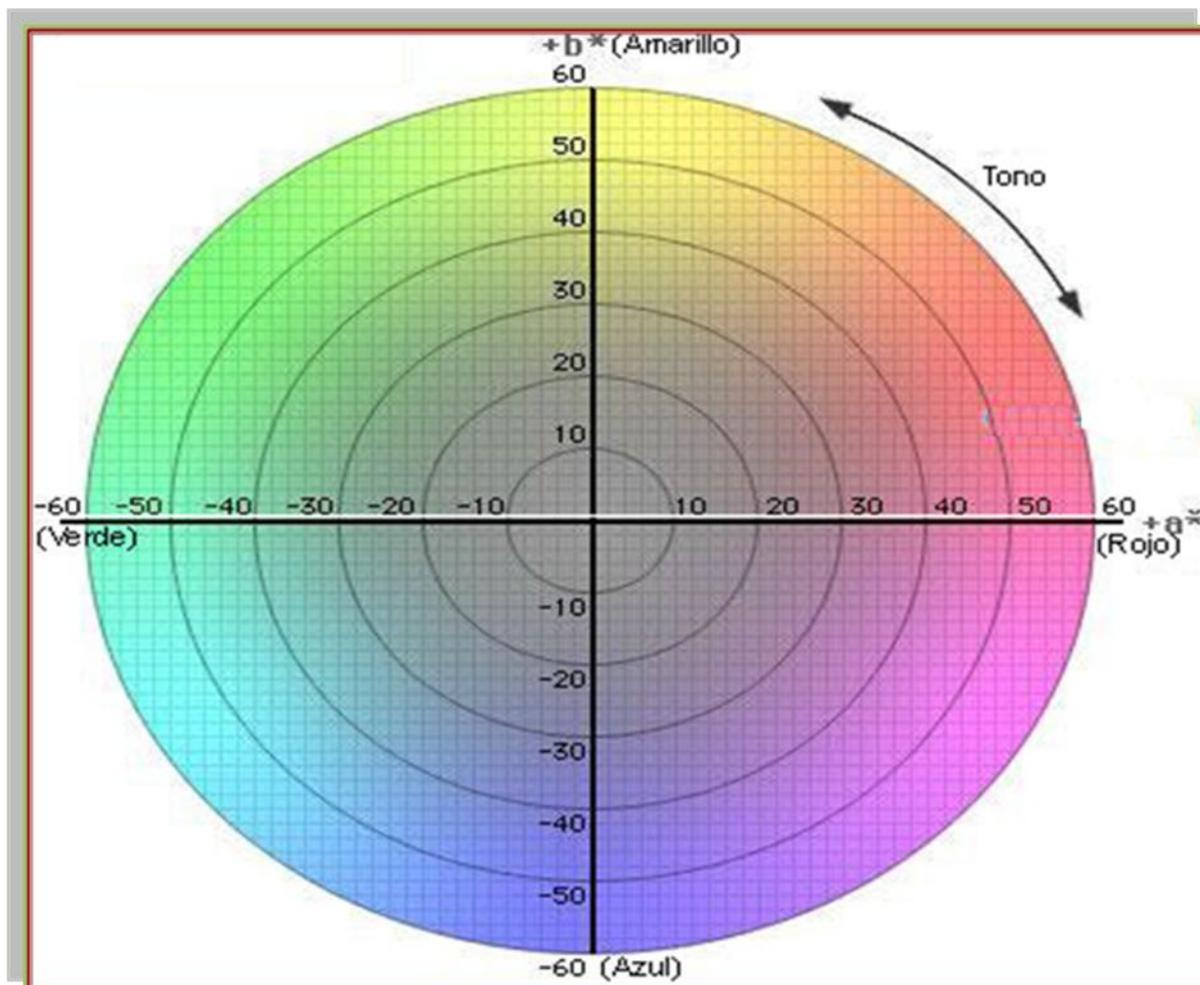


Figura 4. Diagrama de cromaticidad de a^* , b^* .

En este diagrama, a^* y b^* indican direcciones de colores: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul. El centro es acromático; a medida que los valores de a^* y b^* aumentan y el punto se separa del centro, la saturación del color se incrementa (Anónimo, 8).



Capítulo 3

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en tres etapas las cuales consisten en:

1. Extracción de los compuestos con capacidad antioxidante a partir de semilla de aguacate y determinación de contenido de proteína.
2. Evaluar el efecto inhibitorio producido por el extracto de la semilla de aguacate.
3. Determinar la concentración optima del extracto para la inhibición del oscurecimiento de la pasta de aguacate.

3.1.2 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevo a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, a 8 Km. al sur de la ciudad de Saltillo, presentando una latitud Norte de 25⁰ 23', una longitud Oeste de 101⁰ 02' y una altura de 1743 msnm), en distintos laboratorios tales como el de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de Nutrición y Alimentos, de Horticultura, y en el de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo. Blvd. Venustiano Carranza s/n. Saltillo, Coahuila, México.



3.1.3 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

3.1.3.1 Materiales

En la tabla 3 se enlistan los materiales utilizados en el desarrollo de la investigación.

Tabla 3. Materiales utilizados

➤ Vaso de precipitado	➤ Espátula
➤ Gradilla	➤ Micropipeta
➤ Matraz de aforación	➤ Pipetas
➤ Embudo	➤ Pissetas
➤ Termómetro	➤ Papel Filtro
➤ Tubos de plástico para centrifuga	➤ Frascos Gerber
➤ Tubos de ensaye	➤ Agitador
➤ Probeta	➤ Matraz Erlenmeyer 1000 ml
➤ Papel Kleenpack	➤ Cajas Petri



3.1.3.2 Equipos de Laboratorio

Los equipos empleados en la investigación se presentan en la tabla 4:

Tabla 4. Equipos utilizados

-
- ❖ Refrigerador, marca Hotpoint
 - ❖ Congelador, American
 - ❖ Balanza, Sauter
 - ❖ Licuadora, Phillips
 - ❖ Centrifuga Beckman J2-HS
 - ❖ Potenciómetro, Corning
 - ❖ Agitador magnético, Termolyne
 - ❖ Espectrofotómetro, Genesy™
 - ❖ Balanza analítica A&D
 - ❖ Balanza para calibrar
 - ❖ Colorímetro MINOLTA CR-300
-

3.1.3.3 Reactivos

Tabla 5. Reactivos empleados

-
- Buffer fosfatos 0.1 M, pH 7.6
 - Acetona
 - Colorante azul brillante de Comassie
 - Agua destilada
 - Albúmina
 - Etanol al 99.5%
 - H₃PO₄ al 85%
-



3.1.4 MATERIAL VEGETAL

Tanto las semillas como los aguacates fueron adquiridos en el comedor de la misma universidad en la ciudad de Saltillo, Coahuila.

Se consiguieron aproximadamente 5 kg de semillas de aguacate de la variedad Hass y 1 kg de aguacate de la misma variedad, como los presentados en la figura 5; En una etapa de madurez óptima.



Figura 5. Material vegetal utilizado

Cabe mencionar que en el caso de las semillas, estas fueron llevadas al laboratorio de alimentos del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, donde fueron congelados a una temperatura -15° C. En el caso de los aguacates, estos se adquirieron al momento de llevar a cabo las pruebas finales de evaluación del color en presencia de las diferentes concentraciones aplicadas.



3.1.5 ETAPA 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD INHIBITORIA A PARTIR DE LA SEMILLA DEL AGUACATE

La extracción de los compuestos está fundamentada en la precipitación; que consiste en la conversión de proteínas solubles a estado insoluble. La alteración de la solubilidad de una proteína puede lograrse modificando el pH, la fuerza iónica de la suspensión, agregando disolventes o modificando la temperatura (Anónimo, 9).

En el presente trabajo se precipitaron las proteínas por el agregado de solvente orgánico (acetona en frío).

El material congelado fue sometido a una descongelación por un tiempo aproximado de 2 horas, esto para facilitar la liberación de la enzima presente en la semilla por medio del proceso de deshidrocongelación. Posteriormente fue pesado y se le agregó una solución de buffer fosfatos 0.1 M pH 7.6 en una relación de 100 ml de buffer por cada 50 gr de hueso de aguacate, de ahí se sometió a un molido en una licuadora de acero inoxidable, para facilitar una homogeneización de la muestra con el buffer. Esta mezcla se sometió a una centrifugación a 7000 rpm por un tiempo de 25 min. a una temperatura de -3 °C, (cabe mencionar que la temperatura debe ser controlada, ya que si desciende a -5 °C la muestra se congela). Pasado el tiempo se decantaron las muestras, desechando el precipitado y dejando el líquido sobrenadante, el cual representa el extracto crudo que contiene el compuesto proteico de interés.

Este extracto crudo fue medido, y se le agregó el doble de su volumen de acetona fría (-15 °C), esta mezcla se sometió a una centrifugación a 7000 rpm durante 20 min. a una temperatura de -15 °C. El precipitado obtenido, como se muestra en la figura 6, que contiene el compuesto proteico, fue resuspendido en 20 ml de solución buffer fosfatos 0.1 M pH 7.6 para mantenerlo.

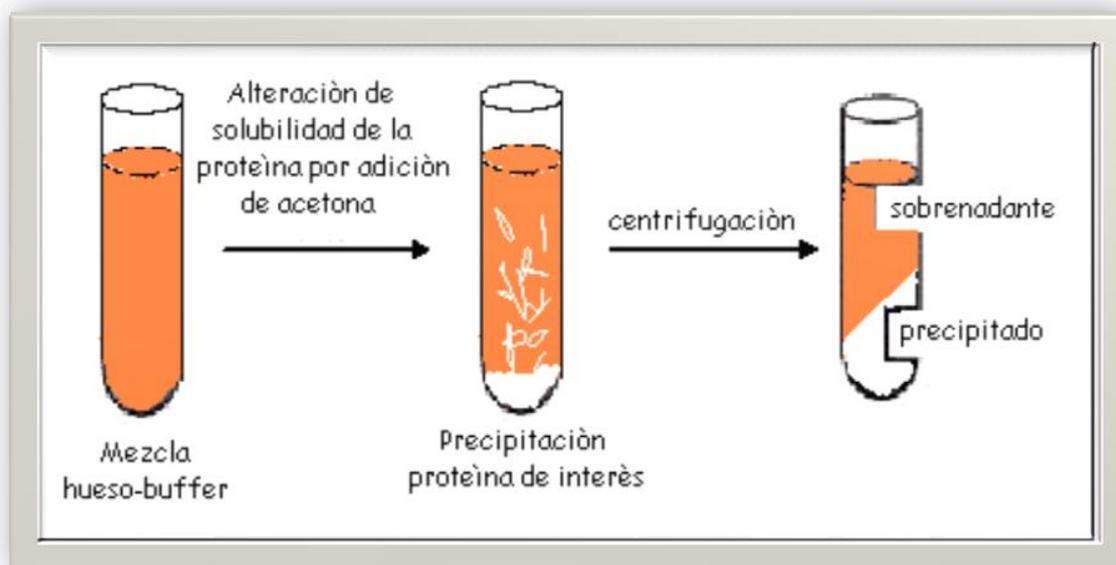


Figura 6. Extracción de compuestos con capacidad inhibitoria

3.1.5.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Este método se basa en la propiedad del colorante azul brillante de Comassie G-250 de unirse a las proteínas, formando un cromóforo de color azul que puede detectarse entre 465-595 nm. El colorante posee mayor afinidad por los aminoácidos básicos y aromáticos.

Se vertió 1 mL de suspensión proteica en un tubo de ensaye, se agregó 1 mL del reactivo de Bradford, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 3 minutos, posteriormente se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro GENESYS UV/Visible. Las lecturas por duplicado fueron relacionadas con la ecuación de la curva patrón de albúmina sérica bovina.

Reactivos

Para la preparación del reactivo se siguió la técnica de Bradford (1976).



3.1.6 ETAPA 2: EVALUAR EL EFECTO INHIBITORIO PRODUCIDO POR EL EXTRACTO DE LA SEMILLA DE AGUACATE

3.1.6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estableció un análisis unifactorial de 3 niveles con factor determinante, siendo un color el factor evaluado, en 3 niveles que son Luminosidad (L) y las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* .

3.1.6.2 MONTADO DEL EXPERIMENTO

Para la determinación de la óptima concentración de inhibidor se pesaron 10 grs. de pulpa de aguacate Hass, en condiciones de madurez óptima, posteriormente fue macerado y adicionado con concentraciones de 0 a 0.25% peso-peso del extracto proteico obtenido en base al contenido de sólidos totales del aguacate en base a lo reportado por Barranco en 2003, se homogeneizó y se realizó la medición de color en el colorímetro Minolta cada 30 min por un período de 6 hrs, tomando lecturas de las variaciones en la escala LAB.

3.1.6.3 ETAPA 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Se aplicó un análisis multivariado de 3 niveles, los cuáles son la Luminosidad (L^*) y las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* , mediante el paquete estadístico JMP 5.0.1., tomando en cuenta la pendiente (m) como indicador de los incrementos o decrementos de la luminosidad y las coordenadas de cromaticidad en función al tiempo de exposición al ambiente de la pasta de aguacate, para establecer la varianza en L y obtener el grado de expresión de la PFO para oxidar la pasta en cuestión, permitiendo así determinar el efecto inhibitorio del compuesto adicionado contra el testigo libre del mismo.



La pendiente (m) está determinada por el cambio en la distancia vertical ($Y_1 - Y_2$) dividida entre el cambio en la distancia horizontal ($X_1 - X_2$) (Stanley, 1998); es decir, la pendiente se define como la cantidad de incrementos de “ y ” en función a un incremento de “ x ”.

Existen varios tipos de pendiente:

- a) Una recta con m positiva es aquella que sube al movernos de izquierda a derecha.
- b) Una recta con m negativa es aquella que baja al movernos de izquierda a derecha.
- c) Una recta con $m=0$ es aquella línea que se presenta horizontalmente.
- d) Una recta con m indefinida es aquella línea que se presenta verticalmente (Goodman, 1996).



Capítulo 4

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados que a continuación se presentan son los generados del presente experimento, enfocado a la obtención de un inhibidor del oscurecimiento enzimático del aguacate Hass (*Persea americana* Var. Mill) a partir de la semilla del mismo, así como la determinación de la concentración óptima del inhibidor.

4.1.1 ETAPA 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD INHIBITORIA A PARTIR DE LA SEMILLA DEL AGUACATE

Se obtuvo un extracto proteico de la semilla de aguacate mediante la precipitación con acetona fría (-15 °C), por medio de una desnaturalización, ya que las moléculas del solvente orgánico interfieren con las interacciones hidrofóbicas en el interior de la proteína. Este precipitado era de color blanco, compacto, y fue resuspendido en 100 ml de buffer fosfatos 0.1 M pH 7.6 para que la proteína volviera a su estructura normal; a diferencia de lo reportado por Barranco (2003), quien menciona que la resuspensión se pudo realizar en 20 ml de buffer fosfatos, en este trabajo se emplearon 100 ml del mismo para lograr la resuspensión, ya que con 20 ml se presentó aún muy saturada ya que había fracciones de proteína que aún no se habían reestructurado, esto se puede deber a que las condiciones de extracción (velocidad de la centrifuga, temperatura) fueron controladas con equipos más sofisticados, por lo tanto se presentó una mayor cantidad de compuesto extraído.

Este precipitado se sometió a una cuantificación de proteína, usando el método de Bradford (1976), y los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 6, expresando el contenido de proteína que hay en 1 Lt



de extracto obtenido. La tabla 6 muestra el contenido de proteína de extracto de hueso de aguacate, mediante el método de Bradford (1976).

Tabla 6. Contenido de proteína del extracto obtenido a partir de semilla de aguacate

Muestra	Abs 595 nm	[Proteína] g/L
Extracto de semilla de aguacate	3.10	3.79

De acuerdo a lo expresado en el cuadro anterior, el extracto contiene proteína, lo cual concuerda con lo reportado por García (1999) acerca de que en la semilla hay presencia de proteínas y lípidos de reserva; pero en este estudio se determinó que existen 3.79 g/L de proteína; sin embargo no se estableció qué tipo de proteína, ya que pueden existir varios tipos de compuestos de naturaleza proteica que fueron extraídos con el solvente, como alguna enzima que compita con la PFO y esta es la que probablemente se encuentre presente y posee la actividad antioxidante, coincidiendo con Gallardo (2003) que reportó la presencia de un compuesto que actúa como inhibidor de la PFO, que está presente en la semilla del aguacate.

4.1.2 ETAPA 2. ANÁLISIS MULTIVARIADO

El análisis multivariado permite hacer una correlación entre las diferentes variables a estudiar.

La correlación se refiere al hecho de que dos variables se encuentran relacionadas y a la estrechez de dicha relación.

La correlación puede ser positiva o directa, cuando la variable “x” es directamente proporcional a “y”; y negativa o inversa, cuando la variable “x” inversamente proporcional a “y”.



En la tabla 7 Se presentan las diferentes correlaciones obtenidas de un análisis multivariado, donde muestra las correlaciones entre la luminosidad y las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* .

Tabla 7. Correlaciones entre $L^*a^*b^*$

	Luminosidad	Color a	Color b
Luminosidad	1.0000	-0.6054	0.8556
Color a	-0.6054	1.0000	-0.7612
Color b	0.8556	-0.7612	1.0000

La luminosidad (L) está correlacionada inversamente con el color a^* , es decir; a medida que la luminosidad disminuye, los valores en la coordenada de cromaticidad a^* aumentan; esto debido a que a^* se mueve del verde al rojo.

De la misma forma presenta una correlación altamente positiva con la variable b^* ; indicando que a medida que pasa el tiempo y L disminuye, también lo hace b^* , que se mueve de la escala de color amarillo al color azul.

En cuanto a la relación de las coordenadas a^* y b^* , se observa una correlación inversa o negativa, debido a que a^* aumenta y b^* disminuye.

La coloración de la pulpa de aguacate es muy heterogénea, coloreada en amarillo claro al interior y verduzco hacia el exterior, por lo que se presentaron diferencias iniciales en los valores de L^* de los tratamientos, debido a lo anterior se procedió a sacar un promedio de todas las lecturas tomadas inicialmente y se determinaron los parámetros iniciales de color de la muestra de aguacate.

Los valores del L^* a^* y b^* obtenidos de cada aguacate a la hora del muestreo representan los valores medios del L^* a^* y b^* , calculados a partir de tres pulsos ligeros separados del colorímetro.



En función al análisis realizado, el promedio de color del aguacate Hass en óptimas condiciones de madurez en la escala L*a*b* es el que se muestra a continuación en la tabla 8:

Tabla 8. Parámetros L*a*b* en aguacate Hass

L*	a*	b*
67.07	9.73	28.82

En relación a los valores obtenidos en la escala L*a*b* en las diferentes concentraciones aplicadas sobre la pasta de aguacate en fresco, la tabla 9 muestra los valores que se presentaron entre el t_0 y el t_f de cada tratamiento.

Tabla 9. Valores obtenidos en la escala L*a*b*

Tratamiento	Coordenadas iniciales			Coordenadas finales		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
0	67.396	-11.526	29.883	43.480	1.483	6.180
0.025	67.210	-10.440	29.960	43.886	1.470	5.970
0.050	70.336	-8.830	29.570	46.590	1.546	7.786
0.100	68.220	-9.533	28.886	47.956	1.406	10.180
0.150	65.706	-10.820	28.276	50.463	-0.333	12.766
0.200	65.110	-9.253	27.553	55.496	-1.870	19.133
0.250	67.630	-9.873	29.316	57.380	-1.683	20.610

En la figura 7 Se localizan gráficamente los valores de las coordenadas iniciales y finales de cada tratamiento, con el fin de ubicar cada punto en su escala correspondiente de colores a partir de las lecturas obtenidas en el colorímetro.

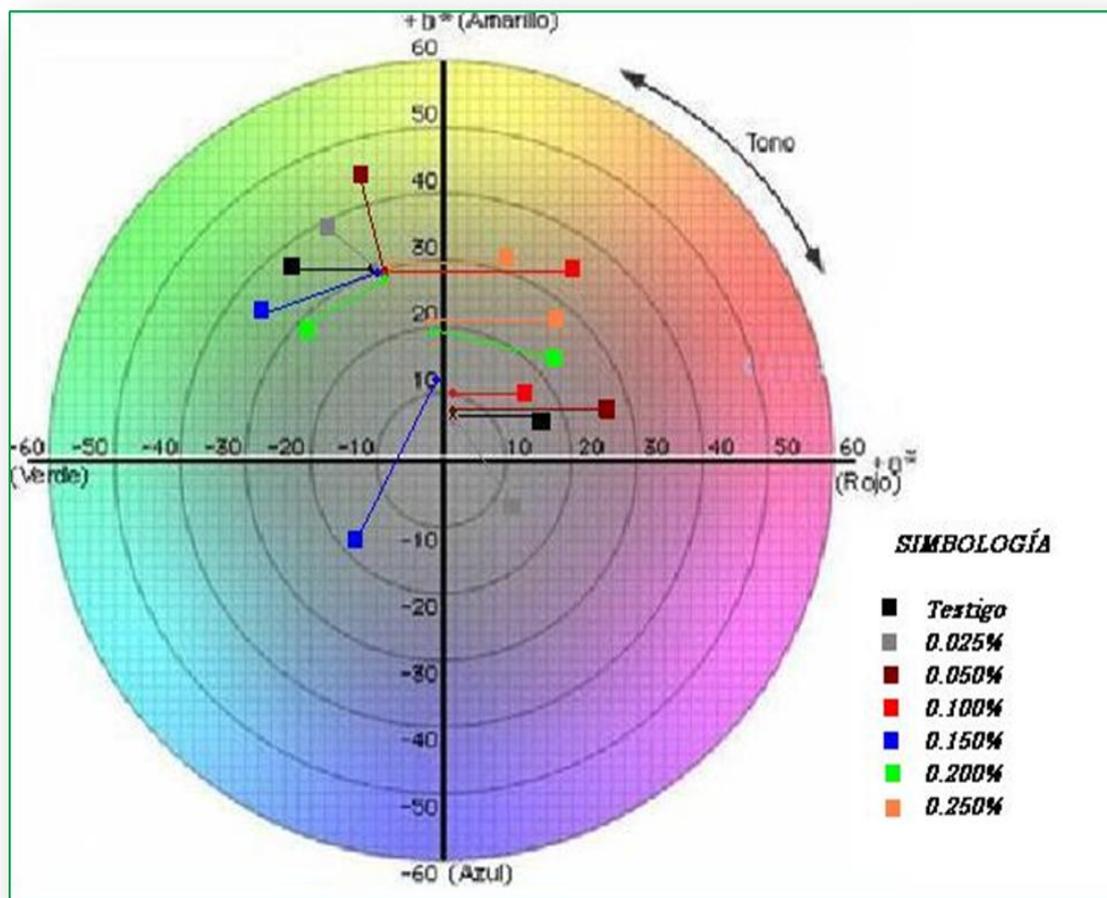


Figura 7. Diagrama de cromaticidad

En la figura 7 se aprecian también las distancias entre las coordenadas a^* y b^* iniciales y las finales, donde es posible apreciar que en la concentración de 0.025% hay una ligera disminución, pero no es significativa; sin embargo, la menor distancia reportada es la que se obtiene al adicionar la concentración de 0.200%; así mismo, en el apéndice II se muestran las fotografías con los colores reales obtenidos en los diferentes tratamientos presentados en el gráfico de cromaticidad, en relación al uso de las diferentes concentraciones utilizadas para retardar el proceso de oscurecimiento enzimático de la pasta de aguacate en fresco.



Es importante mencionar que la pérdida de brillo en las muestras, relacionada a la concentración de color, puede ser debido a que éstas hayan sufrido desecación, que es un fenómeno normal en todas aquellos frutos que son expuestos al ambiente (Desrosier, 1991) o bien puede deberse también a la acción de la PFO (Sánchez-Ferrer y col., 1995).

4.1.3 ETAPA 3. VARIANZA EN L

Se realizó un ANOVA en las 3 variables de respuesta, siendo la luminosidad el parámetro que se tomó en cuenta para establecer la concentración óptima de inhibidor, ya que indica la cantidad de luz que refleja la muestra al momento de la lectura, esto se relaciona con la brillantez y/o la claridad de la misma.

En la figura 8 se muestran las distintas curvas obtenidas con cada uno de los tratamientos aplicados en relación a nuestra variable de respuesta L^* ; a su vez en el apéndice III se incluyen las figuras de las curvas obtenidas en las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* .

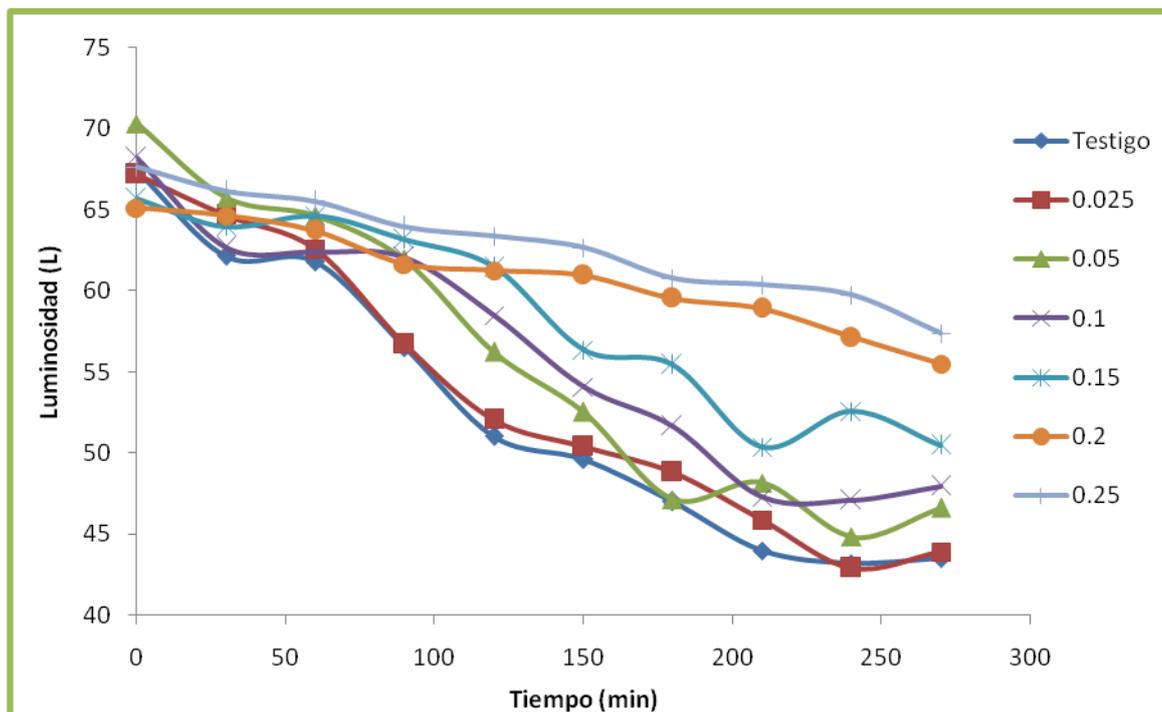


Figura 8. Grado de inhibición de diferentes [proteína] sobre la luminosidad (L)

Como se puede observar en la figura 8, a medida que la concentración de extracto proteico se incrementa, la actividad inhibitoria se ve incrementada hasta alcanzar un máximo en la concentración de 0.200 y 0.250%, sin embargo entre éstas dos no existen diferencias.

Así mismo, y a fin de apreciar más claramente las variaciones de luminosidad con respecto al tiempo y a la concentración de extracto aplicado, se procedió a calcular los cambios de la misma, los cuales son presentados en la figura 9.

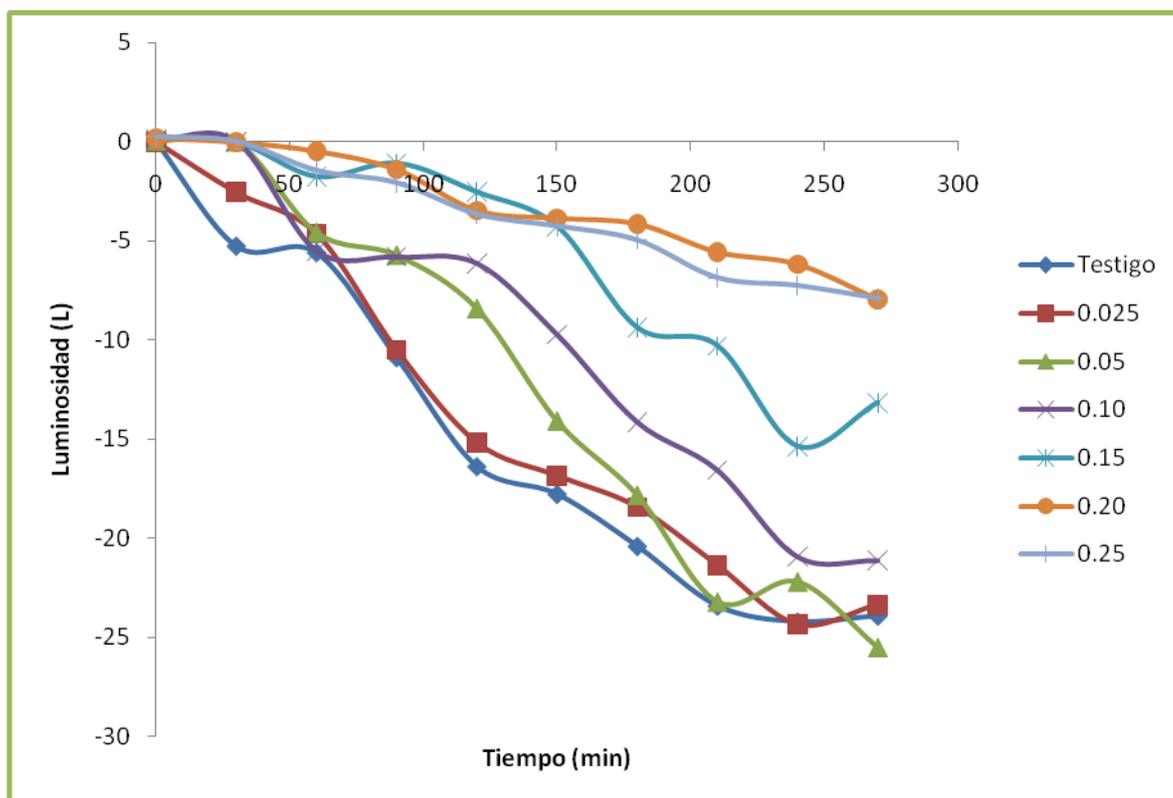


Figura 9. Cambios en la Luminosidad (L)

4.1.3.1 Efecto de la concentración de inhibidor en función a la luminosidad (L^*)

A partir de la valoración del cambio de la luminosidad en función al tiempo y a la adición del compuesto a evaluar es posible apreciar en la figura 9, que los tratamientos de 0.025% y .050% aun cuando presentan niveles inferiores de cambio en lo luminosidad con respecto al testigo sin extracto, las diferencias no son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), (apéndice IV), sin embargo el efecto de la concentración se vuelve apreciable a partir de la concentración de 0.100%, y sigue en aumento alcanzando su máxima expresión en la concentración de 0.200%, observándose un cambio al aplicar la concentración de 0.250% en relación al valor L^*_1 por lo tanto y tomando en cuenta la relación costo-beneficio, se establece que la concentración óptima para inhibir el oscurecimiento enzimático de la pasta de aguacate es de 0.20%,



ya que, al aumentar las concentraciones, lejos de ocasionar efectos benéficos, provocaría un efecto pro-oxidante en la pasta (Djenane *et al*, 2002).

4.1.3.2 Efecto de la concentración vs. el tiempo en función a la luminosidad (L*)

En cuanto a la valoración de los cambios en luminosidad en función a las concentraciones del inhibidor contra los tiempos, es posible observar en la figura 9 que el tratamiento de 0.200% presenta ligeras variaciones, pero éstas no son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), (apéndice V), hasta el tiempo de 180 min, donde se presenta el primer cambio significativo, es decir, que la pasta de aguacate no presentó oscurecimiento enzimático alguno en las primeras 3 horas, de exposición al ambiente, lo que permite asegurar que el compuesto adicionado es estable por 3 hrs, este tiempo es 6 veces mayor al presentado en el control (sin adición).

En la tabla 10 se indican los decrementos presentados en cada tratamiento, donde resalta lo antes mencionado, siendo 0.200% el que presenta menores cambios en los valores en función al tiempo inicial y el tiempo final tanto para L* como en a* y b* menores; Sin embargo en la concentración de 0.250% se aprecia un decremento en el porcentaje de inhibición, por lo que es posible establecer a la concentración de 0.200% como óptima, ya que al continuar incrementando la cantidad de inhibidor se puede lograr el efecto contrario, es decir, una actividad pro-oxidante. (Djenane *et al*, 2002) del extracto sobre la pasta en fresco de aguacate. Se recomienda ampliar el rango de concentración para respaldar lo antes postulado.



Tabla 10. Diferencias entre t_0 y t_f

Tratamiento	L*	a*	b*
0	23.9166	-13.0100	23.7033
0.025	23.3233	-11.9100	23.9900
0.050	23.7466	-10.3766	21.7833
0.100	20.2633	-10.9400	18.7066
0.150	15.2433	-10.4866	15.5100
0.200	9.6133	-7.3833	8.4200
0.250	10.2500	-8.1900	8.7066

Con el objetivo de representar la velocidad de degradación del color, se calcularon las pendientes de la recta de cada uno de los tratamientos. Las velocidades de degradación del color fueron comparadas entre sí para determinar con cual de los tratamientos aplicados se obtiene una pasta de aguacate con una mejor estabilidad del color.

La luminosidad como ya se indicó, es un parámetro a considerar al momento de evaluar un alimento con un colorímetro, ya que indica que tanta claridad o brillantez tiene la muestra (negro [$L^*=0$] y blanco [$L^*=100$]).

La tabla 11 presenta las pendientes calculadas de cada uno de los tratamientos, en relación a la luminosidad, de acuerdo al valor de la pendiente es posible determinar que tanto se expresa la PFO y en consecuencia, en que porcentajes está actuando el compuesto que se fue añadido. En cuanto a la inhibición en la expresión de PFO en relación a las coordenadas a^* y b^* , éstas se observan en el apéndice VI.



Tabla 11. Inhibición en la expresión de PFO en relación a L*

[]	m	Expresión PFO	% de Inhibición
0	1	100	0
0.025	1.0106	100	0
0.050	1.0531	100	0
0.100	0.8617	86.1702	13.8297
0.150	0.6808	68.0851	31.9148
0.200	0.3617	36.1702	63.8297
0.250	0.3723	37.2340	62.7659

La luminosidad tiende a bajar a medida que pasa el tiempo, por lo tanto la pendiente se expresa como negativa para todos los tratamientos, presentándose sin cambios significativos entre el testigo y las concentraciones de 0.025 y 0.050%, indicando que no hubo inhibición de PFO, y que al aumentar la concentración de extracto proteico aplicado a 0.100%, los valores se van acercando a 0, lo que hace que estas tomen forma horizontal, comprobando que la PFO cada vez se expresa menos, y el % de inhibición es mayor con el aumento en las concentraciones.

La muestra tratada con la concentración de 0.200% fue la que presentó el valor más bajo de la pendiente, lo que significa que se presentó la menor degradación de la luminosidad de la pasta de aguacate; contrario a la relación directa concentración-inhibición de la PFO dicha anteriormente, se encontró que la muestra tratada con la concentración de 0.250% presentó una pendiente mayor que el tratamiento a 0.200%; lo que indica que es esta la concentración óptima, ya que a concentraciones mayores no se incrementa el porcentaje de inhibición, y esto no es conveniente desde el punto de vista costo-beneficio, por otro lado al seguir incrementando la concentración del agente se puede llegar a ejercer un efecto pro-oxidante (Djenane *et al*, 2002) el cual resultaría perjudicial en la calidad del producto.



En relación directa a la disminución de la caída de la luminosidad está la expresión de la PFO, ya que entre mas se exprese PFO más rápida es la caída de la luminosidad.

Con el uso del compuesto proteico extraído a partir de la semilla de aguacate Hass fue posible inhibir hasta en un 63.83%, el oscurecimiento aparente de la pulpa de aguacate, aplicando una concentración de 0.200%, en función al parámetro luminosidad.

Datos reportados para un estudio un vitro por Barranco en el 2003, en el cual se hizo reaccionar el compuesto proteico extraído de la semilla de aguacate Hass directamente con PFO, reportan hasta un 94.52% de inhibición, el cual es superior a los valores alcanzados al aplicar otros conservadores como la mezcla sinergista 50:50 de ácido cítrico-ác. Ascórbico, con un 82.70%, un 77.50% con ácido Cítrico y un 63.70% al aplicar m-bisulfito de sodio, de donde es posible apreciar que aun *in vivo* donde la complejidad de la matriz alimentaria tiene un papel importante, los resultados obtenidos, en el presente trabajo, son elevados, ya que son similares a los obtenidos *in vitro* al adicionar m-bisulfito de sodio, e inferiores a los logrados con los otros compuestos, lo cual es de esperarse ya que al trabajar con extractos puros se facilita la interacción de los mismos.

Por otro lado Nilo en 1977 realizo un trabajo utilizando PFO extraída de cambur de manzano; en el cual reporta un punto máximo después del cual el porcentaje de inhibición también disminuyó; como sucedió en el presente trabajo, ya que al adicionar una concentración de 0.200% se alcanza el nivel máximo de inhibición y al incrementar dicha concentración el porcentaje de inhibición no incrementa, sino que disminuye.

Por último, tomando en cuenta la tecnología emergente más usada en derivados de aguacate, el 63.83% de inhibición es menor al reportado por Palou en el 2000, donde aplicó presiones de 689 MPa en 4 ciclos de 5 min



cada uno en guacamole, logrando reducir al 15% la actividad de la PFO; sin embargo, los altos costos generados por este tipo de procesos y los cambios en los atributos sensoriales, permiten la competitividad de el compuesto extraído en esta investigación..

Los resultados obtenidos del presente estudio elucidan la posibilidad de utilizar la semilla del aguacate como fuente de compuestos inhibidores a fin de retardar el oscurecimiento enzimático de la pulpa expuesta del mismo, fenómeno que ya se había observado de forma empírica en las cocinas domésticas al preparar salsas o ensaladas que incluyen aguacate como ingrediente y cuya preparación incluye la adición del hueso entero que, por supuesto, no se consume.

Aún así, si bien los resultados obtenidos del presente experimento son alentadores, no existen reportes en la literatura de algún estudio similar con el cual pudieran compararse, ya sea con el aguacate mismo (otras variedades) o con otros frutos que sufren el mismo fenómeno, por lo que se sugiere ampliar el presente estudio.



Capítulo 5

5.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados arrojados por el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- ✓ Fue posible obtener un extracto con capacidad inhibitoria sobre la enzima PFO de la pulpa de aguacate Hass.
- ✓ El extracto obtenido es de naturaleza proteica
- ✓ Se logró inhibir hasta en un 63.83% la expresión de la PFO, dicho valor es mas alto que el obtenido con el uso de m-bisulfitos de sodio, pero menor al 94.52% obtenido por Barranco (2003), sin embargo estos valores fueron obtenidos a nivel molecular y el factor desecación matriz compleja no se hacen presentes.
- ✓ Los valores de inhibición son menores a los que se logran con el uso de compuestos químicos, pero el extracto aquí propuesto es de naturaleza orgánica.
- ✓ El 63.83% de inhibición es menor a la reducción al 15% en la actividad de la PFO, en guacamole, obtenida por Palou en el 2000, aplicando altas presiones; embargo, los altos costos generados por este tipo de procesos y los cambios en los atributos sensoriales, permiten la competitividad de el compuesto extraído en esta investigación.



- ✓ Es posible retardar el proceso de oscurecimiento enzimático del aguacate por un período de 3 hrs sin presentar cambios estadísticamente significativos en los atributos de luminosidad de la pasta de aguacate, adicionada con una concentración de 0.200%, relación p/p del extracto obtenido, manteniéndose en buenas condiciones hasta por 6 horas, de exposición continua al ambiente.



Capítulo 6

6.1 PERSPECTIVAS

- Comparar con el uso de aditivos químicos, en la misma forma de aplicación para establecer diferencias directas.
- Obtener un preparado consistente en el extracto proteico obtenido sobre una matriz sólida que sirva como vehículo.
- Aplicar el preparado antes señalado a la pasta de aguacate en fresco, para lograr la inhibición de la actividad PFO en la pulpa del mismo.
- Combinar el uso del extracto obtenido a partir de la semilla de aguacate Hass con temperaturas bajas o con sales para buscar incrementar el % de inhibición.
- Aplicar una evaluación sensorial y análisis nutrimental a la pasta sometida a la adición del preparado, para determinar si realmente no hay alteración en sus cualidades organolépticas y nutritivas.



Capítulo 7

7.1 APÉNDICE

APÉNDICE I

Solución madre 0.1 gr en 100 ml= 1 g/L

# tubo	[Albúmina] g/L	A 595 nm
2	0,1	0,855
3	0,2	0,952
4	0,3	1,033
5	0,4	1,1
6	0,5	1,156
7	0,6	1,237
8	0,7	1,269
9	0,8	1,313
10	0,9	1,365
11	1	1,407

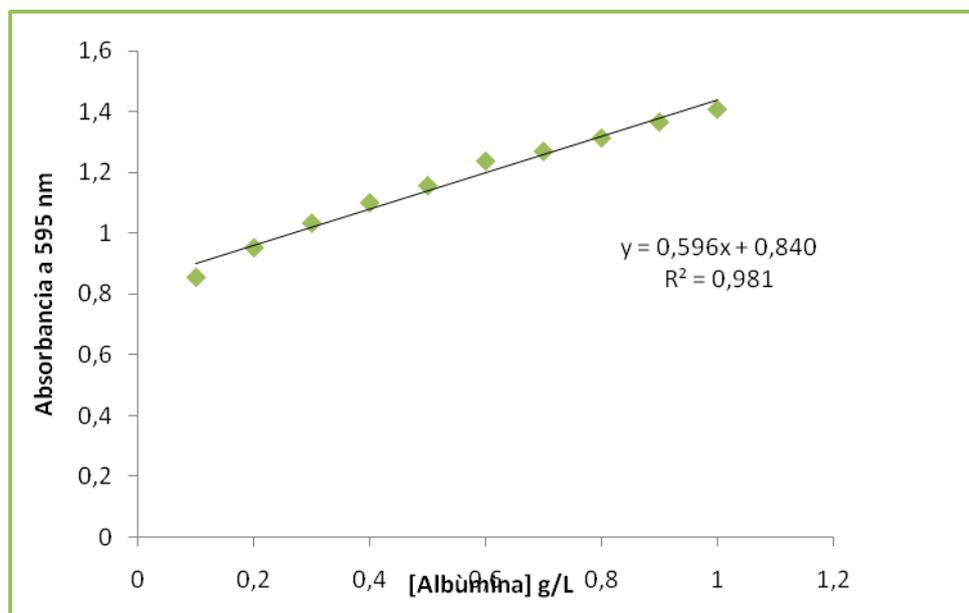


Figura 10. Curva Patrón



APÉNDICE II

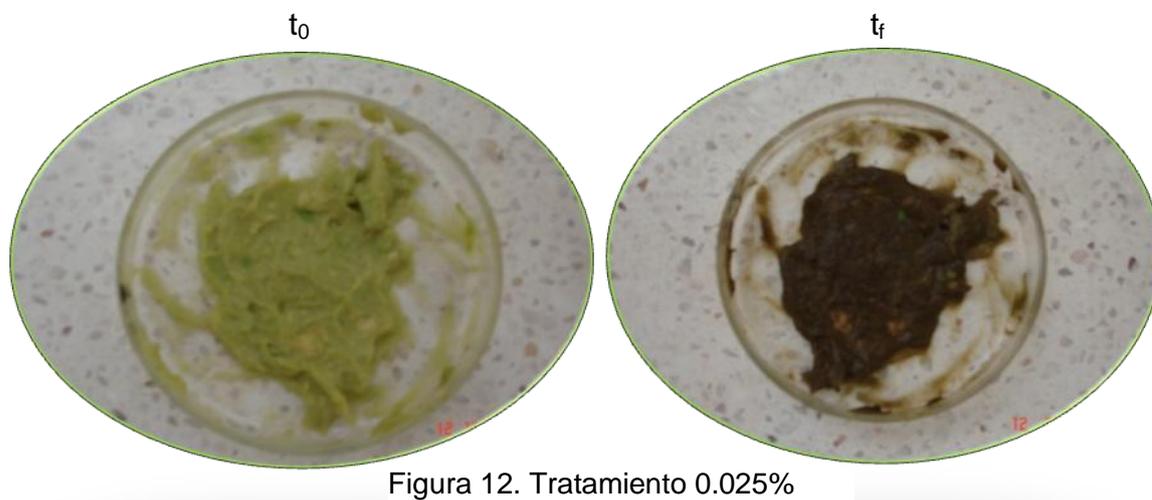
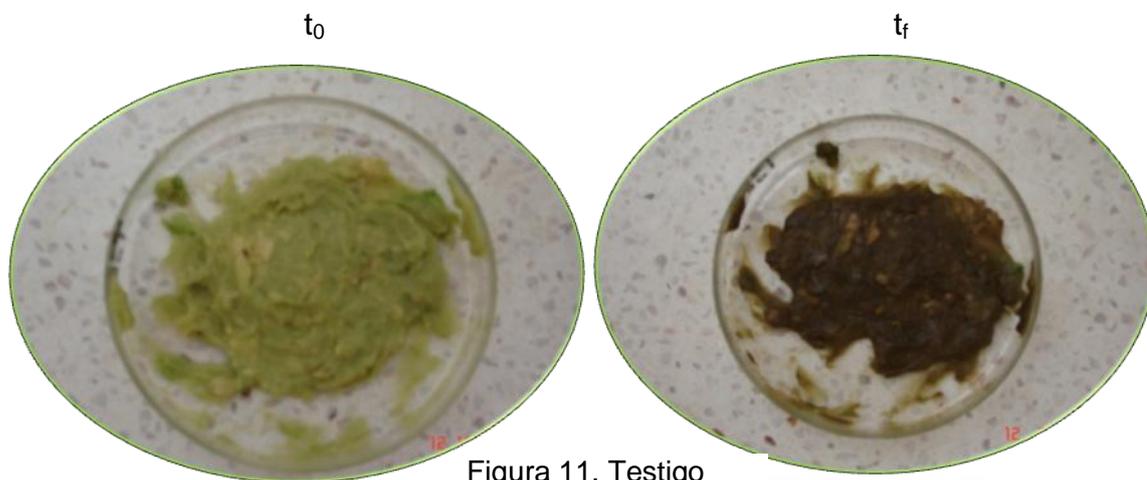




Figura 13. Tratamiento 0.050%

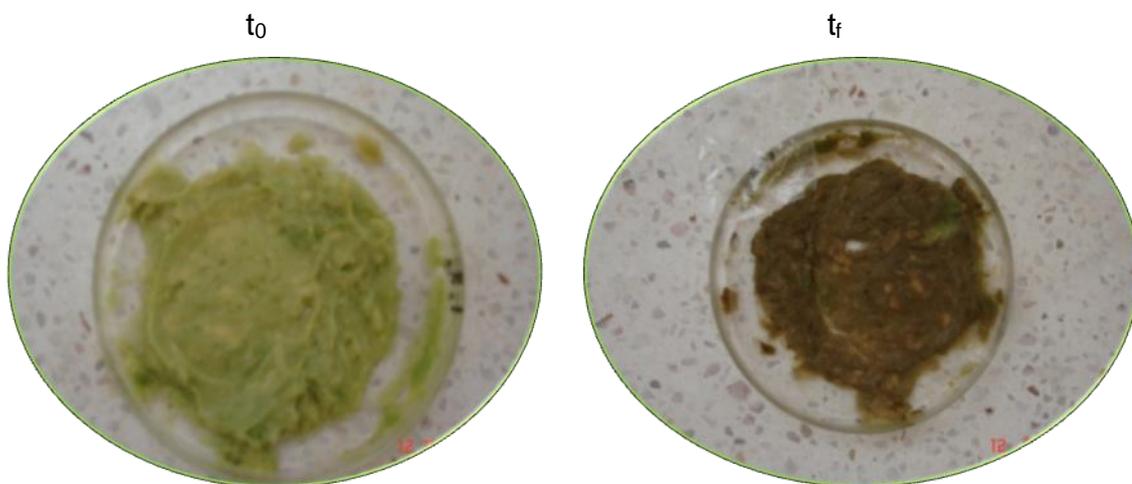


Figura 14. Tratamiento 0.100%

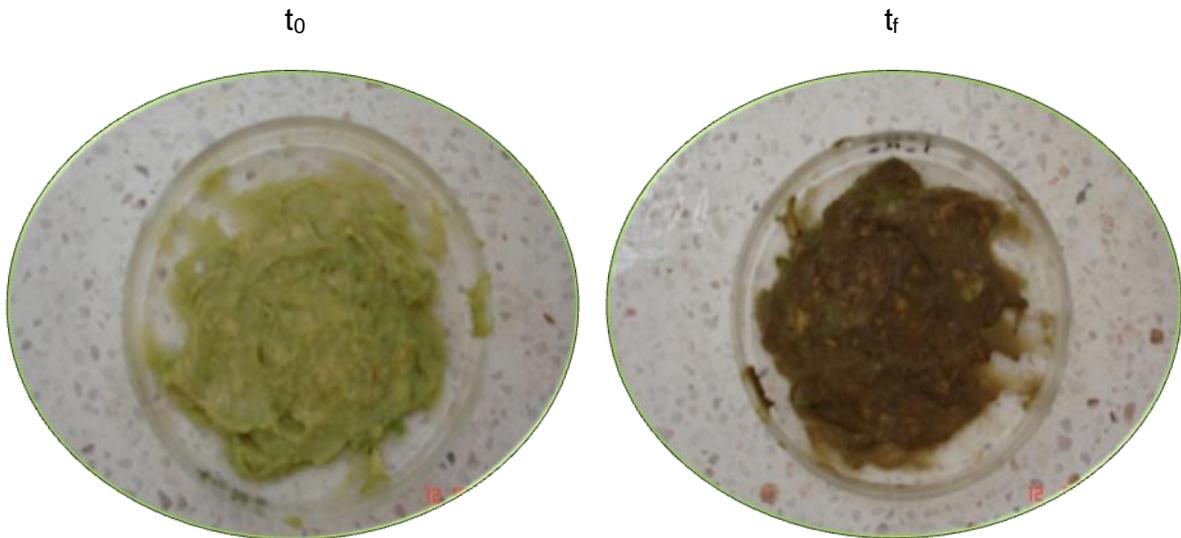


Figura 15. Tratamiento 0.150%

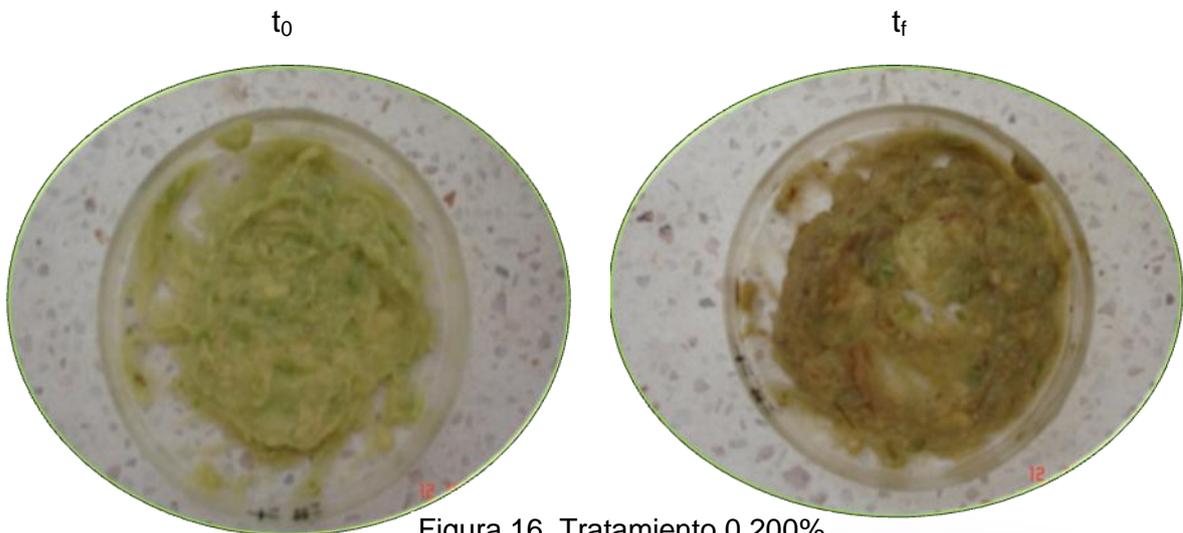


Figura 16. Tratamiento 0.200%



APÉNDICE III

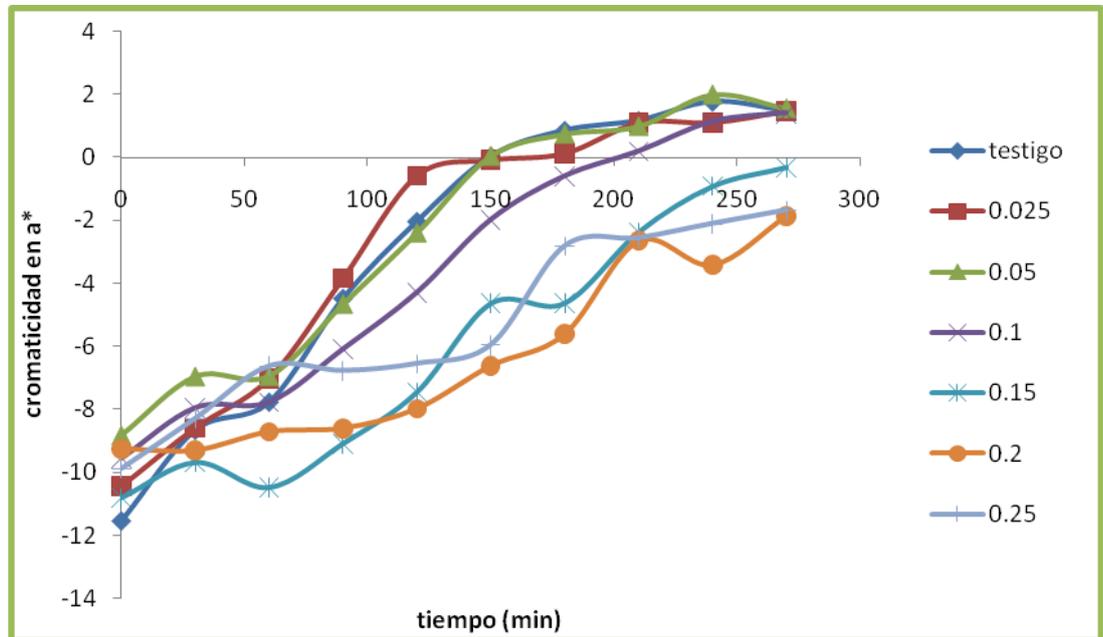


Figura 17. Grado de inhibición de diferentes [proteína] sobre a*

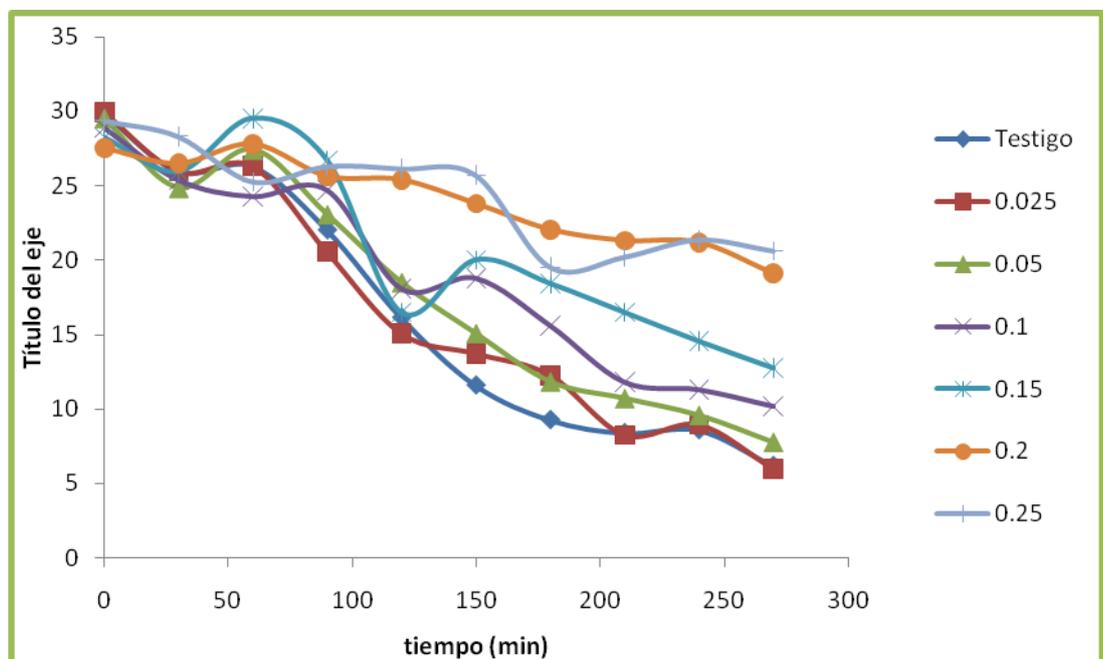


Figura 18. Grado de inhibición de diferentes [proteína] sobre b*



APÉNDICE VI

Tabla 14. Inhibición en la expresión de PFO en relación a la coordenada a*

[]	m	Expresión PFO	% de Inhibición
0	1	100	0
0.025	0.9019	90.1960	9.8039
0.050	0.8431	84.3137	15.6862
0.100	0.8627	86.2745	13.7254
0.150	0.8235	82.3529	17.6470
0.200	0.5686	56.8627	43.1372
0.250	0.5882	58.8235	41.1764

Tabla 15. Inhibición en la expresión de PPO en relación a b*

[]	m	Expresión PFO	% de Inhibición
0	1	100	0
0.025	0.9680	96.8085	3.1914
0.050	0.9042	90.4255	9.5744
0.100	0.7553	75.5319	24.4680
0.150	0.6489	64.8936	35.1063
0.200	0.3297	32.9787	67.0212
0.250	0.3617	36.1702	63.8297



Capítulo 8

8.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ (Anónimo, 1) <http://es.wikipedia.org/wiki/Aguacate>.17/03/2007 14:39:43
 - ✓ (Anónimo, 2) <http://www.aproam.com/CULTIVO/produccion.htm>
17/03/2007 14:45:02
 - ✓ (Anónimo, 3) <http://www.aproam.com/> 17/03/2007 14:43:18
 - ✓ (Anónimo,4)http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=52&id_art=130&id_ejemplar=53 28/02/2007 11:25:16.
 - ✓ (Anónimo, 5) <http://www.euroresidentes.com/Alimentos/aguacate.htm>
17/03/2007 14:40:36
 - ✓ (Anónimo, 6) <http://www.color.us.es/> 11/06/08 11:57 AM
 - ✓ (Anónimo,7)<http://www.umh.es/doctor/fichAsiDoc?asi=8981&caca=2007tor.asp>. 11/06/08 11:58 AM
 - ✓ (Anónimo, 8) <http://www.konicaminoltaeurope.com/pcc/es/part1/13.html>
21/05/08 05:02 pm
 - ✓ (Anónimo, 9) Apuntes de Ingeniería Bioquímica. 2005. Instituto Tecnológico de Celaya.
1. Artés, F., Castañer, M. y Gil, M. I. 1998. Revisión: El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Food Sci. Technol. Int. 4(6): 377-389.
 2. Ayala A. A. 1998. El Aguacatero. Año 1. Número 4. Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate de Uruapan, Michoacán. Obtenido de Californian Avocado Comission.
 3. Barranco, C.F.J. Extracción y evaluación de compuestos con capacidad inhibitoria del proceso de oscurecimiento enzimático de aguacate Hass (*Persea americana*, Var. *Mill*) obtenidos a partir de la semilla del mismo. Tesis Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (2003).



4. Bashan Y, Y Okon., Y Henis. 1985. Peroxidase, polyphenoloxidase, and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato in tomato plants. *Can. J. Bot.* 65:366-372.
5. Brom, R. E. Carvalho, C. Francisco. 1966. El aguacate. Editor Juan Lozaya Dávila.
6. Calvo R.M., Sevillano C.E., Robinson S.D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. 1991. Ed. Acribia.
7. Carbonaro, M. y Mattera, M. 2001. Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Regina bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv, Williams). *Food Chemistry.* 72: 419-424.
8. Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Rovere, P. & Amati, A. 1997. Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape must. *Food Chemistry* 60: 647-649
9. Colquhoun, D. M.; Moores, D.; Somerset, S.; Humphries, J. A. Comparison of the effects on lipoproteins and apolipoproteins of a diet high in monounsaturated fatty acids, enriched with avocado, and a high-carbohydrate diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992, 56, 671-677.
10. Corrales-García J. (1991). Experiencias y problemática de la industrialización del aguacate. *Memorias del Seminario Internacional del Aguacate. Poscosecha y Comercialización.* México. p.p. 64-71.
11. COVARRUBIAS, G.I. 1984. Comportamiento de la pulpa de aguacate (*Persea americana* mill) var. Hass ante diferentes aditivos y variación de temperatura. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
12. Desrosier, N.W. 1991. Conservación de Alimentos. Editorial Continental. México, D.F. p.p 157-196.
13. Djenane, D.; Sánchez-Escalante, A.; Beltrán, J. and Roncalés, P. (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosmaric acid, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry.* 76: 407-415.



14. Dominic W.S. Wong. Química de los alimentos. Mecanismos y Teoría.. Editorial Acribia 1989.
15. El Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) 2006.
16. Farr, D. 1990. High pressure technology in the food chemistry. Trends in Science and Technology. July, 14-16.
17. Fersini, A. *El Cultivo del Aguacate* (Avocado production); Editorial Diana: México City, 1975.
18. FIRA, 1997, Situación y Perspectivas Económicas de la Producción de Aguacate en México; Banco de México, S. A; División de Planeación; Pág. 62 – 68.
19. Gallardo., S.J.M. Purificación y caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasa de aguacate Hass (*Persea americana, Var. Mill*) y del compuesto inhibitorio presente en la semilla del mismo. Tesis Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. (2003).
20. García E., DM Barret. 2004. Fresh-cut fruits. In: Processing Fruits. Science and Technology. Barret, Somogyi y Ramaswamy (Eds). 2nd Edition. CRC Press. Boca Raton Florida. USA. P 53-72.
21. GARCÍA-Fajardo, J.A; Ramos-Godínez, M. del R; Mora-Galindo, J. Estructura de la semilla de aguacate y cuantificación de la grasa extraída por diferentes técnicas. 1999. Revista Chapingo. Serie Horticultura 5: 123-128.
22. George, D. R. La industria del aguacate. Boletín universidad de Florida. Primera edición 1974.
23. Gil MI., Tuleda JA., Espín JC. 2005. Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. Capítulo 8. Pp 155-176.
24. Giacinti, M.A. 2002. Visión mundial del consumo de aguacate o palta. Revista Agroalimentaria No.14 Enero-Junio 2002 pp. 43-50.



25. Goodman, A., Goodman, H., Lewis, H., Palmas, A. 1996. Álgebra y Trigonometría con Geometría Analítica. Pearson Education. Pàg.109.
26. Gorny JR., B Hess-Pierce., AA Kader. 1998. Effects of fruit ripeness and storage temperatura on the deterioration rate of fresh-cut peach and nectarine slices. *Hort Sci.* 33: 110-113.
27. Grncarevic M., JJ Hawker. 1971. Browning of Sultana grapes berries during drying. *J. Sci. Food Agric.* 22: 270-272.
28. Harbowy ME., DA Balentine. 1997. Tea chemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16:415-480.
29. Junquera, B., González, M.L. y Díaz, E. 1992. El oscurecimiento enzimático en uva y vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 35(5): 484-491.
30. Khan, V. (1985). Effect of proteins, protein hidrolizate and aminoacids on o-hidroxiphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom and avocado. *J. Food Sci.* pp 111-115.
31. Laurila E., R Kerniven., R Ahvenainen. 1998. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest News Info.* 9: 53N -66N.
32. Lee, C.Y.; J.R. Whitaker. 1995. Enzymatic browning and its Prevention. ACS Symposium Series 600, pp 2-7. Washington, DC, USA.
33. López-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas, G. V., Welti-Chanes, J., & Swanson, B.G. (1999). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 31, 549–556.
34. MacDonald, L. y Schaschke, C. L. 2000. Combined effect of high pressure, temperature and holding time on polyphenoloxidase and peroxidase activity in banana. *J. Sci. Food Agric.* 80: 719-724.
35. Makris, D. P. y Rossiter, J. T. 2002. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymatic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chemistry.* 77: 177-185.



36. Mayer, A. (1982) Polyphenol oxidase in plant. Recent Progress. *Pytochemistry* 26: 11-19.
37. Mazzaferaa P., SP Robinson. 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffe. *Phytochemistry*. 55: 285-296.
38. McEvily AJ., R Iyengar., WS Otwell. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*32: 253-273.
39. McHugh TH., E Senesi. 2000. Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *J.Food. Sci.* 65: 480-485.
40. Monica Villegas-Ochoa., J. Fernando Ayala-Zavala, Reynaldo Cruz Valenzuela, Javier Hernández y Gustavo A. González-Aguilar. 2005. Efecto antioxidante de extractos naturales en manzana 'Red Deliciosos'. Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados" La Habana, Cuba. Pp 25-32.
41. Monsalve-González A., GV Barbosa-Cánovas., RP Cavalieri., AJ McEvily., R Iyengar. 1993. Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-hexilresorcinol as anti-browning agent. *J. Food Sci.* 58: 797-800; 826).
42. Morales, O. (1994). El cultivo del aguacate. En: frutas tropicales (memorias de curso). ICA-CORPOICA. pp90-96.
43. Nicolas JJ., FC Richard-Forget., PM Goupy., MJ Amito., SY Aubert. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 34: 109-157.
44. Nicoli MC., M Anese., C Severino.. 1994. Combined effects in preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruit. *J. Food Qual.* 17: 221-229.
45. Ortiz A, Mora R, Santiago T, Dorantes L. 2003. Obtención de una pasta de aguacate mediante tratamiento térmico. Proceedings V World Avocado Congreso. pp. 761-768.



46. Palou, E., Hernandez, C., López, A., Barbosa, G., Swanson, B., Welti, J. 2000. High pressure processed guacamole. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* 1, 69-75.
47. Philippon J., J Maestre. 1993. El pardeamiento enzimático de las frutas y hortalizas. Mecanismos y métodos industriales de prevención. II Congreso Internacional de Tecnología y desarrollo alimentario. Murcia.
48. RAMOS, M. del R. 1999. Estudio Comparativo de la Obtención de Oleorresina de Semilla de Aguacate (cv. Hass) Por Diferentes Técnicas Extractivas. Tesis de Maestría. CUCEI. U. de G.
49. Rouet- Mayer MA., J Philippon., J Ralambosa. 1990. Roles of α -quinones and their polymers in the enzymic browning of apples. *Phytochemistry.* 29:435-440.
50. Salazar-García, S. 2002. Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. INPOFOS, INIFAP. Querétaro, México.
51. Sánchez-Ferrer A., J.N Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. García-Carmona. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biophys. Acta.* 1247:1-11.
52. Sapers GM., RL Millar., 1998. Browning inhibition in fresh-cut pears. *J.Food Sci.* 63: 342-346.
53. Sarma, P. R., Singh, C. N. y Goswami, A. M. 2001. Actividad de la polifenoloxidasas en mango (*Mangifera L. Indica*) en lo referente a comportamiento floreciente y a la incidencia de la malformación. *Frutas.* 56: 219-224.
54. Smith, J.; Goldweber, S.; Lamberts, M.; Tyson, R.; Reynolds, J. S. Utilization potential for semi-tropical and tropical fruits and vegetables in therapeutic and family diets. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 1983, 96, 241-244.
55. Stanley R. Clemens., Phares G. O`Daffer., Thomas J. Cooney. 1998. Geometría. Pearson Education. Pág. 512.
56. Teliz, D. 2000. El aguacate y manejo integrado. Ediciones Mundi – Prensa. Primera edición.



57. Thygesen PW., IB Dry., SP Robinson. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
58. Tomás-Barberán FA., JC Espín. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants de quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Chem.* 47:2571-2578.
59. Vámos-Vigyázo L. 1981. Polyphenol oxidase and Peroxidase in fruits and vegetables. CRC. *Cirit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
60. Vaughn K.C., AR Lax., S.O Duke. 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with established function. *Psysiol. Plant.* 72:1256-1260.
61. Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Hendrickx, M., 1998. High pressure inactivation of polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* 63: 873-877.
62. Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology for the food science. New York Marcell Decker, Inc pp 636.
63. Whitaker, J. R. y Lee, C.Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In: Lee, C. Y.; Whitaker, J. R. (eds) Enzymatic browning and its Prevention. Washington, DC, USA; ACS Symposium Series 600, pp 2-7.
64. Wills, R. B. H.; Lim, J. S. K.; Greenfield, H. Composition of Australian foods. 31. Tropical and sub-tropical fruit. *Food Technol. Aust.* **1986**, 38, 118-120, 122-123.
65. Wong, T. C., Luh, B., Whitaker, J. R. 1971. Effect of phloroglucinol and resorcinol on the clingstone peach polyphenol oxidasecatalyzed oxidation of 4-methylcatechol. *Plant Physiol.* 48: 24-30.