

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**  
**“ANTONIO NARRO”**  
**DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL.**



Extracción y Evaluación de Compuestos con Capacidad Inhibitoria del  
Proceso de Oscurecimiento Enzimático Obtenidos de la Semilla de

Aguacate Criollo

( *Persea nubigena* L. Wms. var *nubigena*).

**Por:**

**YESICA MARO PAREDES.**

**T E S I S**

Presentada como requisito parcial para

obtener el Título de

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Mayo del 2003.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**  
**“ANTONIO NARRO”**  
**DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL.**



**EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD  
INHIBITORIA DEL PROCESO DE OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO  
OBTENIDOS DE LA SEMILLA DE  
AGUACATE CRIOLLO**

*( Persea nubigena L. Wms. var nubigena).*

Por:

**YESICA MARO PAREDES**

**T E S I S**

Presentada como requisito parcial para obtener el Título de:  
**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. MAYO DEL 2003.**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS.**

**EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD INHIBITORIA  
DEL PROCESO DE OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICA OBTENIDOS DE LA SEMILLA  
DE AGUACATE CRIOLLO**

*( Persea nubigena L. Wms. var nubigena).*

**Por**

**Yesica Maro Paredes**

**Tesis**

**Que somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Par  
Obtener el Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**APROBADA**

---

**M.C. MARÍA HERNÁNDEZ GÓNZALEZ.**

**PRESIDENTE**

---

**M.C. OSCAR N. REBOLLOSO P.**

**VOCAL**

---

**M.C. XOCHITL RUELAS CHACÓN**

**VOCAL**

---

**PhD. ANA ILINÁ A. D.**

**VOCAL SUPLENTE**

---

**ING. JOSÉ RODOLFO PEÑA ORANDAY  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. MAYO 2003.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** (ALMA TERRA MATER) por la oportunidad que me brindo para lograr mis estudios de Licenciatura.

AL **Departamento de Nutrición y Alimentos** por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

A los Profesores de la **Carrera de Ciencia y Tecnología de Alimentos** por el apoyo académico, su trato amable y confianza.

AL **Departamento de Asuntos Asistenciales** por la oportunidad de pertenecer al internado femenino de la institución , así como el derecho a comedor durante mis estudios de licenciatura.

A los profesores del los **Departamentos Administración, Socioeconómicas, Calculo y Estadística, Maquinaria, Agrotecnia, Fitomejoramiento, Botánica**, por su apoyo y confianza, ya que formaron parte del programa académico de la carrera.

## DEDICATORIAS

A **DIOS**, por su infinita misericordia, por ser el único que no me abandona y juzga, porque en todo camino, situación y circunstancia esta conmigo, mi único sustento, el **AMOR** que le da sentido a mi vida.

A mi Chulada de Mujer, a mi Mami, **Ma. Lourdes Paredes Contreras**, por su Amor incondicional, confianza, enseñanza y cuidado, por ser mi fortaleza, la causa de mi **Ser**.

A mis hermanas **Yulia** y **Ayari** por sus consejos y por haber compartido las dos primeras etapas de mi vida importantes que son la niñez y la adolescencia, que formaron parte de mi persona.

A mi hermana **Yahaira**, por haber compartido junto a mí los momentos más importantes, los de felicidad y los difíciles, hasta este momento de mis estudios universitarios, y sobre todo por preocuparse y querer siempre lo mejor para mi.

A mi tío **Emiliano Paredes Contreras**, por haberme dado la oportunidad de seguir mi estudios sin ninguna responsabilidad para conmigo, y por ser el respaldo y sustento de mi Familia, **mil gracias**.

A mis tíos **Ma. Artemia Paredes C.** y **Gonzalo A. De La Cruz Elvira**, por su apoyo y consejos.

A mis primos **Nancy, Bismarck, Sonia y Octavio**, por su aceptación y por formar parte de mi familia.

A mis amigos Norma Martínez Mtnz. y Francisco Ávila por haber formado parte de mi superación personal, al confiar en mí y no permitir que me quedara en el camino de la desesperación , por confiar y demostrarme que valgo mucho para ellos, les estoy muy agradecida y los quiero mucho.

## INDICE GENERAL.

|  |    |
|--|----|
| <b>INDICE DE CUADROS</b>   | 1  |
| <b>INDICE DE FIGURAS</b>   | 2  |
| <b>RESUMEN</b>   | 3  |
| <b>CAPITULO 1: INTRODUCCION.</b>   | 5  |
| 1.1 Justificación  | 7  |
| 1.2 Objetivos  | 8  |
| 1.2.1 Objetivo general   | 8  |
| 1.2.2 Objetivos específicos  | 8  |
| <b>CAPITULO II. MARCO TEORICO</b>  | 9  |
| 2.1 Origen e Historia  | 9  |
| 2.2 Distribución geográfica.   | 11 |
| 2.2.1 Mundial.   | 11 |
| 2.2.2 Nacional.  | 12 |
| 2.3 Importancia económica.   | 13 |
| 2.3.1 Nacional.  | 13 |
| 2.4 Importancia regional Michoacán.  | 14 |
| 2.5 Clasificación taxonómica.  | 15 |
| 2.6 Fruto del aguacate   | 15 |
| 2.7 Características específicas del aguacate criollo ( <i>Persea nubigena</i> L. Wms. var. <i>nubigena</i> ).                              | 16 |
| 2.8 Composición química.   | 16 |
| 2.9 Valor nutritivo.   | 17 |
| 2.10 Importancia del aguacate en la salud humana.  | 18 |
| 2.11 Conservación.   | 19 |
| 2.12 Utilización del aguacate.   | 20 |
| 2.13 Tipos de oscurecimiento.  | 21 |
| 2.13.1 Pardeamiento no enzimático.   | 22 |
| 2.13.2 Pardeamiento enzimático.  | 22 |
| 2.13.3 Mecanismos de la reacción   | 23 |
| 2.14 Función y expresión de la polifenoloxidasa  | 25 |
| 2.14.1 Características del enzima  | 26 |
| 2.14.2 Productos secundarios   | 27 |
| 2.14.3 Mecanismo de oxidación  | 27 |
| 2.15 Métodos para la inhibición del oscurecimiento enzimático  | 28 |
| 2.15.1 Aplicación de aditivos químicos en la conservación de los alimentos para inhibir el proceso de oscurecimiento enzimático            | 28 |
| 2.15.2 Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos para inhibir el proceso de oscurecimiento enzimático | 31 |
| 2.16 Investigaciones sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasa en frutos  | 32 |
|  |    |
| <b>CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS</b>  | 34 |
| 3.1 Etapas del trabajo de investigación  | 34 |

|  |   |    |
|--|---|----|
| 3.2  | Localización  | 35 |
| 3.3  | Material de laboratorio   | 35 |
| 3.4  | Equipo de laboratorio   | 36 |
| 3.5  | Reactivos   | 36 |
| 3.6  | Material Vegetal  | 37 |
| 3.7  | Extracción  | 37 |
| 3.7.1                                      | Extracción de Enzima PPO  | 37 |
| 3.7.2                                      | Extracción de compuestos con actividad inhibitoria de la PPO a partir de semilla  | 38 |
| 3.8  | Ensayo de Actividad Enzimática  | 38 |
| 3.9  | Determinación del Contenido de Proteína   | 38 |
| 3.10                                       | Caracterización de las condiciones óptimas para la actividad enzimática   | 39 |
| 3.10.1                                     | Determinación de la concentración de enzima inicial   | 39 |
| 3.10.2                                     | Efecto de la temperatura  | 39 |
| 3.10.3                                     | Efecto de los inhibidores   | 39 |
| <b>CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION</b> |   | 40 |
| 4.1  | Obtención de extractos a partir de las diferentes fracciones del aguacate Criollo <i>Persea nubigena</i> . (pulpa, semilla completa y pulpa de la semilla)  | 40 |
| 4.2  | Seguimiento cinético de la actividad enzimática de los extractos obtenidos a partir de la pulpa de aguacate en función a la concentración del extracto  | 42 |
| 4.3  | Efecto de la temperatura  | 44 |
| 4.3.1                                      | Determinación de la temperatura óptima  | 44 |
| 4.4  | Estudios del proceso inhibitorio  | 46 |
| 4.4.1                                      | Proceso de inhibición con aditivos químicos   | 46 |
| 4.4.2                                      | Proceso de inhibición con adición de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo <i>Persea nubigena var. Nubigena</i>   | 48 |
| 4.4.2.1                                    | Aplicación de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo <i>Persea nubigena var. Nubigena</i> a pulpa de aguacate en fresco  | 49 |
| 4.4.3                                      | Seguimiento espectrofotométrico de la inhibición de la actividad enzimática de la PPO con adición de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo <i>Persea nubigena var. Nubigena</i> | 50 |
| <b>CAPITULO V: CONCLUSIONES</b>            |   | 54 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>          |   | 56 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| <b>CUADROS</b> |   | <b>PAG.</b> |
|----------------|---|-------------|
| No. 1          | Valor promedio por cada 100 g de aguacate criollo " <i>Persea nubigena</i> var. <i>nubigena</i> " crudo en peso neto                            | 19          |
| No. 2          | Material de laboratorio   | 38          |
| No. 3          | Equipo de laboratorio utilizados  | 39          |
| No.4           | Características de los extractos obtenidos a partir de pulpa y semilla de aguacate Criollo  | 45          |
| No. 5          | Actividad de la PPO en función del volumen del preparado enzimático añadido a la mezcla de reacción   | 47          |
| No. 6          | Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PPO del aguacate criollo   | 49          |
| No. 7          | Efecto de diferentes concentraciones de inhibidores químicos con concentraciones diferentes, sobre la actividad de la PPO del aguacate Criollo. | 51          |
| No. 8          | Efecto de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate utilizados como inhibidores de la actividad de la PPO en fresco               | 54          |
| No. 9          | Efecto de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate utilizados como inhibidores de la actividad de la PPO del aguacate criollo    | 55          |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>FIGURAS.</b> |  | <b>PAG.</b> |
|-----------------|--|-------------|
| No. 1           | El pirocatecol y sus derivados, sustrato que participa en el proceso de oscurecimiento | 23          |
| No. 2           | Fases de transformación enzimática de compuestos fenoles a polímeros coloreados        | 24          |
| No. 3           | Presentación de la actividad enzimática en función del volumen de la PPO               | 46          |
| No. 4           | Representación de la actividad enzimática en función a la temperatura                  | 49          |
| No. 5           | Inhibidores químicos a la misma concentración para observar su grado de inhibición     | 52          |
| No.6            | Extractos de aguacate Criollo con efecto inhibitorio                                   | 56          |

## RESUMEN

El aguacate es de gran interés en la industria alimentaria por poseer una gran riqueza en grasas, proteínas y vitaminas, así como por estar clasificado entre los más nutritivos. Un porcentaje elevado, es consumido en fresco principalmente, debido a su pronto deterioro. Este proceso es causado por las reacciones bioquímicas de oscurecimiento enzimático y su auto oxidación, presentada durante el procesamiento y post – cosecha de las frutas y verduras ricas en compuestos fenólicos.

Se han utilizado diferentes técnicas para la reducir el proceso de oscurecimiento enzimático. En el presente trabajo de investigación se muestra la obtención y caracterización cinética de extractos enzimáticos del aguacate criollo “*Persea nubigena var. nubigena*”.

Para la obtención de los extractos se emplearon técnicas para determinar las condiciones de trabajo del enzima responsable del proceso, encontrándose que la temperatura óptima se encuentra alrededor de los 30°C.

Se aplicaron aditivos químicos comúnmente empleados para retardar dicho proceso encontrándose que el mayor porcentaje de inhibición fue presentado al adicionar 900 µM de la mezcla sinérgica, presentando un 86.4%, seguido por el ácido cítrico, el ascórbico y finalmente el m-bisulfito de sodio con un 85.3, 73.5 y 61.09% de inhibición respectivamente, a la misma concentración.

En cuanto al uso de la semilla como inhibidor de este proceso se pudo observar que poseen actividad inhibitoria sobre la enzima PPO de la pulpa de aguacate criollo, lo cual fue medido espectrofotométricamente y comparado con los valores obtenidos del uso de la enzima en ausencia de estos extractos dichos porcentajes son 83.990 y 82.315% para el extracto obtenido a partir de semilla completa y pulpa de semilla respectivamente, valores similares a los observados en presencia de los compuestos químicos anteriormente mencionados a 0.9mM.

Finalmente en un estudio en fresco se demostró que la aplicación de extractos de pulpa y de semilla completa permite retardar el proceso de obscurecimiento por un periodo de 5 horas, 18 veces mayor que en el control sin adición de extractos.

## **CAPÍTULO I.**

### **INTRODUCCIÓN**

El aguacate presenta una gran importancia en el mercado internacional debido, no solo a las amplias posibilidades para el consumo en fresco sino también para el procesado (guacamole, congelados, sorbetes, helados y pastas).

El pardeamiento enzimático es la transformación de compuestos fenólicos en polímeros coloreados frecuentemente pardos o negros, que no se presenta en los alimentos de origen animal, sino en alimentos vegetales ricos en ácidos grasos insaturados. Sin embargo, la formación de este color oscuro no es siempre un inconveniente, ya que en algunos procesos se busca un ligero pardeamiento, por ejemplo: en la maduración de los dátiles, la preparación de la sidra, en la fermentación del té, en el secado de los granos fermentados del cacao, así como durante el secado del tabaco.

Tomando en cuenta la importancia que tiene la conservación en la calidad de frutas y verduras, es necesario controlar y disminuir el grado de pardeamiento enzimático, que se presenta durante su pelado, corte o proceso industrial y evitar que se presenten características no deseadas en el producto final.

El aguacate es uno de los frutos que mayormente presenta dicho pardeamiento, ya que la mayoría de sus ácidos grasos son poliinsaturados y favorecen este tipo de reacción.

Algunos investigadores como Corse (1964) y Whitaker (1976), citan que el oscurecimiento ocurre por la acción de una enzima (o múltiples enzimas), por ejemplo: la polifenoloxidasas, que oxida al catecol a orto-quinonas.

Existen numerosos medios para evitarlo, pero por razones de costos, toxicidad, reglamentación o efectos secundarios desfavorables sobre la calidad, en la práctica sólo se utilizan algunos: como la selección de variedades en sustratos fenólicos, la inactivación por el calor, la adición de compuestos reductores y la inmersión de frutas en soluciones.

En la presente investigación se hace énfasis, en el estudio de la enzima responsable de dicho proceso así como en la extracción, evaluación de compuestos antioxidantes obtenidos de la semilla de aguacate criollo (*Persea nubigena* L. Wms. var. *nubigena*) y la inhibición que estos extractos efectúan sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasas a partir del fruto anteriormente mencionado.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

El aguacate, es un fruto muy apreciado, y cada vez es mayor el número de personas que lo incluyen en su dieta en diversas formas (ensaladas, sopas, guisados, postres, bebidas). Sin embargo el uso de este fruto se ve afectado debido a que su vida de anaquel es corta a causa del deterioro que sufre por diferentes reacciones bioquímicas como el oscurecimiento enzimático, por esta razón su comercialización en el procesado, se ve disminuida, y este problema, es también causado por daños mecánicos durante el almacenamiento y la post-cosecha.

Este trabajo pretende evaluar al principal agente responsable del proceso de oscurecimiento enzimático del aguacate, así como a los compuestos que se utilizan para atenuar dicho evento, los cuales alteran sus propiedades organolépticas de los alimentos. Y en los resultados generados proponer y evaluar el uso de conservadores obtenidos a partir de la semilla de la propia fruta para atenuar dicho proceso y emitir un juicio sobre la viabilidad del uso de estos, para que el aguacate conserve su aspecto normal al ser sometido a diferentes procesamientos.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener extractos enzimáticos a partir del aguacate criollo (*Persea nubigena* L. Wms var. *nubigena*) para su caracterización cinética.

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener extractos crudos parcialmente purificados que contengan a la enzima PPO responsable del proceso de oscurecimiento enzimático a partir de pulpa de aguacate criollo.

- Establecer las condiciones óptimas bajo las cuales la enzima polifenoloxidasas, obtenida del aguacate criollo que cataliza el proceso de oscurecimiento enzimático.

- Evaluar el grado de inhibición producido por aditivos químicos comúnmente empleados para evitar el oscurecimiento enzimático.

- Extraer los compuestos, a partir de la semilla de aguacate criollo, para evaluar su capacidad de inhibición en el proceso de oscurecimiento enzimático en dicho fruto.

- Aplicar los extractos obtenidos de la semilla de aguacate en pulpa fresca del mismo fruto y evaluar su efecto visualmente.

## **CAPITULO II.**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 ORIGEN E HISTORIA DEL AGUACATE**

El aguacate, es el fruto del árbol del mismo nombre originario de Mesoamérica, que abarca las regiones de México y Guatemala, la palabra “aguacate” se deriva de la lengua náhuatl “aoacatl” o “ahualcatl”. Se dice que los arqueólogos han demostrado su existencia desde hace 12,000 años.

A medida que el conocimiento, consumo y procesamiento del aguacate, se ha extendido por otras regiones del mundo, la palabra originaria del náhuatl ha sufrido nuevos cambios y adaptaciones fonéticas a otras lenguas, como es el caso de “avocado” de la lengua inglesa, “avocatier” para el francés y “abacate” para el portugués. En algunas regiones de América del Sur como Venezuela y Colombia se utiliza la palabra “palta” para designar al aguacate, lo cual sugiere un conocimiento de este fruto antes de la llegada de los españoles en el siglo XVI (Revista, ANIAME, 2002).

Se piensa que todos los aguacates cultivados históricamente parten de dos especies de *Persea*: *P. americana* Mill. y *Persea nubigena* L. Wms, con dos variedades botánicas en cada una de ellas. El centro de origen de las especies a las cuales pertenecen los aguacates serían las tierras altas, centrales y orientales de México hasta Guatemala.

Existen seis especies de *Persea*, todas relacionadas con este fruto y nativas de esta área, como también los híbridos considerados como naturales, los cuales fueron descritos originalmente desde allí (Williams, 1952).

Popenoe, tratando de evidenciar cuales precursores de los aguacates cultivados se había originado desde Honduras hasta Colombia, concluyó que el centro obvio de origen era el ya señalado para especies de *Persea* y que solo dos especies corrían desde Honduras, pero con una cercana relación genética con las especies señaladas para México y Guatemala (Williams, 1952),

Las cuatro variedades, de las cuales se mencionan dos para cada especie son:

- *Persea americana* Mill, var. *drymifolia*. Es el aguacate mexicano y el más antiguo usado como alimento por el hombre. Se usó antes del desarrollo de la agricultura hasta nuestros días. Hay evidencias arqueológicas que muestran el uso, en estratos de cuevas, en el Valle de Tehuacán, Puebla, México, que datan de 7000-8000 años a.C..

- *Persea americana* Mill var. *americana*. Es el aguacate de las Indias Occidentales. Su uso se extendió desde México hasta Perú. Evidencias arqueológicas señalan la existencia de este tipo de aguacate en Perú desde hace 3000 años a 4000 años.

- *Persea nubigena* L. Wms. var. *nubigena*. Es el ancestro del aguacate de Guatemala, el cual tiene una población relativamente homogénea, distribuida en toda la faja de la Cordillera de Talamanca en Costa Rica, población que se hace amplia en Guatemala, también se localizan poblaciones silvestres de esta especie en las montañas altas y bosques

nublados de Honduras y Nicaragua, la distribución es amplia y de formas muy silvestres de *P. Nubigena*, la cual pudo haber dado a una selección por tamaño entre los pueblos, de las formas primitivas de aguacates allí encontrados.

• *Persea nubigena* L. Wms. var. *guatemalensis*. Es el aguacate de Guatemala. Se estima como el mejor aguacate aparecido en tiempos de la conquista de América y el origen del mismo, se atribuye a formas silvestres de *P. Nubigena* L. Wms var. *nubigena*, profundamente dispersas como ya fue señalado en bosques altos, montañosos desde México hasta Guatemala.

Otras especies de aguacate explotados como cultivo son también originarios del área de Centro América; así tenemos *Persea steyenmarkii* Allen, el cual se considera muy cercano a *P. Nubigena*, aunque difiere del color del follaje y la venación de la hoja. Esta especie es reportada para Guatemala y El Salvador. *Persea schiediana* Nee y *P. Caerulea* Stand, son reportadas para Costa Rica (de la Luz José, 1999).

## **2.2 DISTRIBUCIÓN DEL AGUACATE**

### **2.2.1 MUNDIAL**

La distribución del área de cultivo de aguacate resulta bastante extensa, estando comprendida entre los 32<sup>o</sup> de latitud norte y los 36<sup>o</sup> de latitud sur de Ecuador, e interesa a los países del Centro y Sudamérica, hasta unas regiones de Norteamérica (California y Florida), todo el Continente Africano, China e Indochina, las Filipinas, las Islas Hawai, y las Islas Canarias (Fersini, 1975).

El centro de expansión de este producto fue México, distribuyéndose en el centro y hacia el sur de América y, muy posteriormente a la colonización, llegó a otros puntos fuera del continente (Rodríguez, 1982).

### **2.2.2 NACIONAL.**

En atención a la evidencia histórica y las relaciones de parentesco (fitogenéticas) entre las diferentes variedades de aguacate, a México se le considera como el lugar de origen de esta especie, lo que se confirma al constatar la existencia de una amplia variabilidad genética localizada en las vertientes del Pacífico Centro-Sur y Golfo de México y en algunas áreas de la Meseta Central, vegetando en una gran diversidad de ambientes (SARH-INIA, 1981).

La producción de aguacate en nuestro país se encuentra localizada en siete estados, principalmente en Michoacán, Puebla, México, Morelos, Nayarit, Guerrero y Sinaloa, los cuales en conjunto concentran el 96% de la superficie y de la producción nacional (SARH,1994). Siendo el aguacate Hass, *Persea americana variedad Mill*, el más ampliamente cultivado debido a sus características, más sin embargo el aguacate criollo *Persea nuigena L. Wms. variedad nubigena* esta presente aún , ya que en México tiene una riqueza invaluable en esta variedad (CICTAMEX, 1991), por esta razón es importante preservar y rescatar el peligro de su inminente extinción, debido a la sustitución de huertos de aguacate Hass. Se a planteado un proyecto, donde se define un catálogo y un método para

la conservación de semillas y plantas de ecotipos de variedades criollas y silvestres con la finalidad de usarlos en un Banco de Germoplasma (Barrientos,1997), y posteriormente para el enriquecimiento y generación de nuevas variedades ( Pérez, 1986), para estudios filogenéticos y de fitomejoramiento (Gallegos, 1982), para contribuir en el rescate, preservación y conservación ( Roldan A., Aguirre S., et. al, 1999).

## **2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL AGUACATE**

### **2.3.1 NACIONAL**

La producción de aguacate muestra gran dinamismo a nivel nacional a partir de los años setenta, el crecimiento observado alcanzó un ritmo promedio de 11% aproximadamente, ahora en la actualidad posee un crecimiento anual de 4-5% que equivale de 3,160 a 3,900 hectáreas nuevas.

Siguiendo los mismos registros de SARH, la llamada franja aguacatera de Michoacán se forma de 79,186 hectáreas sembradas que en 1988 produjeron 475,186 toneladas de aguacate con valor de \$ 140,000 millones de pesos.

El lugar predominante que México ocupa en la producción mundial de aguacate, revela su importancia en el ámbito nacional y el gran dinamismo de su crecimiento, sobre todo en las últimas décadas. En 1993 entre los principales frutos que más se consumieron en el país, el aguacate ocupó el cuarto lugar en superficie cosechada, el sexto en producción y el séptimo en valor de la producción.

Michoacán, Puebla, México, Morelos, Nayarit, Guerrero y Sinaloa son los principales estados productores de todo el territorio nacional, ya que en las más de 80,000 Ha que se producen en México 66,362 ha las produce Michoacán.

Las cifras de SARH indican que entre 1970 y 1988, el número de Ha. , creció 21 veces y 12 veces más los rendimientos.

De 1988 a 1993, la superficie destinada al cultivo del aguacate ha tenido variaciones siendo de 110,018 a 80,544 Ha. Durante este periodo su cultivo ha presentado un comportamiento descendente. Los rendimientos obtenidos, se han mantenido entre 7.7 y 8.6 ton/Ha (SARH, 1993).

## **2.4 IMPORTANCIA DEL AGUACATE EN MICHOACÁN**

Michoacán es el estado que más contribuye en la producción global de aguacate y en consumo, ya que tiene el 87% de la superficie en producción y el resto en desarrollo del rendimiento por hectárea que se estima en 8.6 ton.

El cultivo se distribuye en forma comercial en 25 municipios de la entidad {ha adquirido una considerable importancia en la economía estatal, el 72% de las unidades de producción tiene un régimen de tenencia de pequeña propiedad y el resto pertenece al sector social. Se distinguen como áreas de máxima producción los municipios de Uruapan, Tacámbaro, Chilchota, Tancítaro y Zaracuaretiro. La variedad predominante es el aguacate Hass, en menor escala la conocida como la fuerte y algunos criollos que anteriormente describimos su situación e importancia de su extinción por la sustitución de variedades, pero se tiene un interés en su rescate, preservación y conservación de ella. El desarrollo de las

técnicas de cultivo ha permitido cosechar durante todo el año, aunque el periodo de producción intensa es en los meses de octubre-marzo y el de menor producción de mayo- septiembre (SARH, 1993).

El estado de Michoacán, constituye la principal región productora del país y del mundo, contribuyendo con más del 60% de la producción nacional y con más del 90% de la producción de la variedad Hass, que también es preferida en nuestros mercados (Fruticultura de Michoacán ,1986).

## 2.5 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según Weegahd y Fersini (1975) mencionan la siguiente clasificación:

|                |                |                  |               |
|----------------|----------------|------------------|---------------|
| <b>REINO:</b>  | Vegetal        | <b>SUBREINO:</b> | Fanerógamas   |
| <b>TIPO:</b>   | Angiospermas   | <b>DIVISIÓN:</b> | Spermatophita |
| <b>CLASE:</b>  | Dicotiledóneas | <b>SUBCLASE:</b> | Dapétalas     |
| <b>ORDEN:</b>  | Ranales        | <b>FAMILIA:</b>  | Lauraceae     |
| <b>GENERO:</b> | Persea         | <b>ESPECIE:</b>  | Nubigena      |

## 4.6 FRUTO DEL AGUACATE

El fruto constituye una baya voluminosa con una semilla grande. Presenta cuatro formas: alargada, aperada, redondeada y ovalada. El fruto consta de tres partes: corteza, pulpa y semilla.

La pulpa o porción comestible varía desde la carne del membrillo hasta la suave de la mantequilla, su color debe ser verde o amarillo, con una capa

próxima a la semilla de un blanco sucio, casi inodoro y sabe algo parecido a la avellana (Fersini, 1975).

La forma de la semilla varía de acuerdo con la especie, así en la variedad *drymifolia* es ovoide y en la *P. americana* es esférica; a veces llena la cavidad o queda suelta en el interior del fruto. Es dicotiledonia normalmente y poliembriónico, cubierta con una película compuesta de dos membranas. Los cotiledones se unen por el embrión que es prominente y bien desarrollado.

El tamaño varía, según el tipo ecológico, oscilando de 50 gr. a 2.5 kg., el color de la cáscara varía desde el negro brillante al verde amarillento, presentando a veces matices rojizos, y están compuestos enteramente de tejido ovárico, puede ser de 7 a 20 cm. de largo y de 7 a 10 cm. de diámetro (Ochse et al, 1982).

## **2.7 CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL AGUACATE CRIOLLO (*Persea nubigena* L. Wms. var. *nubigena* L. Wms.).**

Este aguacate es muy común en bosques nublados y montañas desde Puebla y Veracruz en México, hasta montañas altas de Honduras, Guatemala y Nicaragua, sus frutos son pequeños, 3 a 4 cm. de diámetro, globosos o raramente piriformes y verdes. La pulpa es esparcida y raramente de más de 4 mm. de espesor.

## **2.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUACATE**

La composición química de todas las variedades del aguacate es similar, así como su biodisponibilidad nutrimental y es aquí donde destaca este fruto, con relación a todo lo conocido, ya que su fácil preparación y su estado natural sin

necesidad de cocción hacen que permanezcan intactas todas las concentraciones de vitaminas, minerales y nutrientes que posee.

Cada porción de aguacate equivale en calorías a 50 gramos de pan, a un plato de fideos, a un plato de ensalada de tomate y zanahoria con aceite, o a un huevo relleno pero en ninguno de los ejemplos mencionados alcanza el valor bioenergético de este vegetal, especialmente en los que se refiere a proteínas, vitaminas y minerales.

El fruto del aguacate tiene gran riqueza en grasas del 6 al 30% de la pulpa, el contenido en proteínas permite clasificarlo entre los frutos más ricos en dicho componente, también es bastante rico en vitamina A y B, medianamente en vitamina E, y pobre en vitamina C (Álvarez, 1979).

## 2.9 VALOR NUTRICIONAL DEL AGUACATE

Realmente el aguacate ha sido dotado de una composición química notable y de ello se están dando cuenta numerosos países del mundo que comienzan a adoptarla en sus programas de alimentación (Vidales, 1992).

Cuadro No. 1 **Valor promedio por cada 100g de aguacate criollo *Persea nubigena* L. W.ms variedad *nubigena* crudo en peso neto.**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Porción comestible</b> | <b>53.00%</b>   |
| <b>Energía</b>            | <b>144.00 kcal.</b>   |
| <b>Lípidos</b>            | <b>*Grasas totales en g.....13.50</b><br><b>*Colesterol mg.....0.00</b><br><b>*Saturados totales en g. ....2.44</b> |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
|                             | *Monoinsaturados (olico) g. .... 8.97<br>*Polinsaturados (linolico) g. ....1.84   |
| <b>Minerales</b>            | *Calcio mg. ....24.00<br>*fosforo mg. ....42.00<br>*hierro mg.....0.50<br>*magnesio mg.....45.00<br>*sodio mg.....4.00<br>*potasio mg.....604.00<br>*zinc mg.....0.42   |
| <b>Vitaminas</b>            | *Retinol mcg.....200.00<br>*Ac. Ascorbico mg.....14.00<br>*Tiamina mg.....0.09<br>*Riborlamina mg.....0.14<br>*Niacina mg.....1.90<br>*Tiroxina mg.....0.28<br>*Ac. Fólico mg.....62.00<br>*Covalina.....0.00 |
| <b>Proteína</b>             | <b>1.60 g.</b>  |
| <b>Hidratos de carbonos</b> | <b>7.60 g.</b>  |
| <b>Fibra</b>                | <b>2.50 g</b>   |
| <b>Humedad</b>              | <b>74.00%</b>   |

## 2.10 IMPORTANCIA DEL AGUACATE EN LA SALUD HUMANA

El aguacate es un alimento rico en potasio y pobre en sodio, relación favorable para el descenso de la presión arterial y la disminución de la susceptibilidad de ciertas enfermedades cardiovasculares y vásculo-cerebrales que no dependen de la presión arterial.

El contenido de cobre es significativo, integrando los grupos de alimentos fuente de este mineral; 100 g de porción comestible aportan aproximadamente el 21% de los requerimientos diarios promedio para adultos. Cabe recordar que el

cobre es indispensable en el metabolismo del hierro en la síntesis de la hemoglobina, el pigmento melanina y proteínas del tejido conectivo. También se asocia su deficiencia con otros trastornos neurológicos y cardíacos.

El aguacate también es fuente de magnesio, micronutriente esencial para el funcionamiento normal del encéfalo y el metabolismo de los carbohidratos. La deficiencia de magnesio está asociada a trastornos clínicos algunos de ellos muy frecuentes, como los gastrointestinales.

No es dulce ni salado y algunos piensan que sus grasas no son saludables y engordan, pero la realidad es que contiene abundante agua (70-75%) y bastantes proteínas (1.2%). Para tratarse de una fruta, con un gran contenido de aminoácidos en los que falta la cisteína y el triptofano y que combina bien con frutos secos, lácteos y los huevos. Su nivel de azúcar es bajo (5-7%) y destaca la fibra vegetal.

El aguacate tiene efectos benéficos adicionales ya que elimina el colesterol dañino a la salud y reduce el riesgo de desarrollar arteriosclerosis. También es útil en pacientes con asma y artritis reumatoides, esto al promover un aumento de las lipoproteínas de alta densidad reducida y triglicéridos.

## **2.11 CONSERVACION EN LOS ALIMENTOS**

Si la conservación de un alimento consiste en mantener la calidad del mismo, entonces deben conocerse las causas de alteración que atentan contra cualquiera de sus propiedades.

Hay muchos agentes que pueden destruir las peculiaridades sanas de la comida fresca. Los microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras estropean los alimentos con rapidez. Las enzimas, presentes en todos los alimentos frescos, son sustancias catalizadoras que favorecen la degradación y los cambios químicos que afectan, en especial, la textura, apariencia y el sabor.

La conservación de los alimentos como medio para prevenir tiempos de escasez ha sido una de las preocupaciones de la humanidad. En lo que concierne al aguacate para su conservación se utilizan frigoríficos con temperaturas no menores a los 4.5 °C ni mayores a los 10°C, con atmósfera del 85% de humedad y un porcentaje de anhídrido carbónico del 3%, superior al normal de la atmósfera, con esto tiene una duración aproximada de 25 días.

El tiempo de almacenamiento, del aguacate, no debe de exceder mas de 30 a 40 días, ya que los niveles de polifenoloxidasas aumentan a medida que el almacenamiento se prolonga, haciendo a la fruta más susceptible (Paz, 1978).

Los aguacates conservados a temperaturas inferiores a 4.5°C suelen sufrir alteraciones en su color ya que cambia a pardo y negro, y tanto el sabor de la pulpa como el olor se vuelven desagradables.

Un 95% de la producción de aguacate, en el país se consume fresco o en forma de guacamole al cual se le agrega, para evitar su oscurecimiento, 200 mg de ac. ascórbico, y 30 mg de bisulfito de sodio por para cada 100 gramos de guacamole, pero dicho tratamiento le confiere los sabores característicos de estos productos, alterando su delicioso sabor.

## **2.12 UTILIZACIÓN DEL AGUACATE**

El aguacate se consume de varias formas, se puede comer solo, pero es altamente compatible con otros productos por lo cual se consume como salsas, cremas, entremeses, ensaladas, postres, sopas, tortillas etc.

Así como su utilización en:

- La industria de los cosméticos, en la formulación de lociones, cremas y jabones para el tratamiento y cuidado de la piel.

- La industria farmacéutica, como base de pomadas, ungüentos y bálsamos. En la actualidad se estudian otras formas de utilizar el aceite del aguacate en medicamentos y nutraceuticos.

El inconveniente más fuerte que presenta el uso del aguacate en la industria alimenticia es el proceso del oscurecimiento enzimático, el cual afecta directamente al producto mermando sus características organolépticas y su calidad nutrimental.

## **2.13 TIPOS DE PARDEAMIENTO EN LOS ALIMENTOS**

Son dos los procesos que pueden llevar a la obtención de colores desagradables en los alimentos, el oscurecimiento de tipo no enzimático y el

enzimático. En estos procesos se altera no solo el color como ya se mencionó, sino que también los cambios son a nivel de sabor, textura y valor nutricional.

### **2.13.1 PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO**

Al pardeamiento no enzimático también se le conoce como “reacción de “Maillard”, “caramelización “ o “formación de melanoidinas”.

Los substratos de estas reacciones son compuestos carbonilos y en primer lugar azúcares reductores (compuestos polihidroxicarbonilo). Los aminoácidos y las proteínas participan y catalizan estas reacciones por intermedio de grupos amino libres; también se observa una pérdida de valor nutritivo cuando el ácido ascórbico y la vitamina K participan en estas reacciones. El oscurecimiento no enzimático se presenta durante los procesos tecnológicos o el almacenamiento de diversos alimentos. Se acelera con el calor y por lo tanto se acusa durante las operaciones de cocción, pasteurización y deshidratación.

La prevención del pardeamiento no enzimático, se hace por eliminación de substratos, descenso del pH, vigilancia de la temperatura y humedad, además de la adición de agentes inhibidores.

### **2.13.2 PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO**

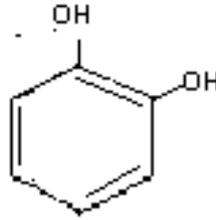
Se denomina “ pardeamiento enzimático” a la transformación, enzimática en sus primeras etapas de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, frecuentemente pardos o negros.

El pardeamiento enzimático no se presenta en alimentos de origen animal. Es evidente en la mayoría de las frutas peladas cortadas y tiene lugar rápidamente después de la ruptura de las células. Sin embargo, la formación de este color oscuro no es siempre un inconveniente, por ejemplo se busca un ligero pardeamiento en la maduración de los dátiles, en la preparación de la sidra, fermentación del té, secado de los granos fermentados del cacao, así como durante el secado del tabaco.

Existen numerosos sustratos naturales del pardeamiento enzimático: mono, di o polifenoles, su capacidad reactiva es más o menos elevada según su estructura y también según el origen de las enzimas que catalizan su oxidación.

Además, una gran parte de estos sustratos se clasifican entre los principales constituyentes fenólicos de los vegetales son:

La 3,4-dihidroxifenilalanin(DOPA) para el caso de la papa, la 3,4-dihidrofeniletilamina o dopamina para los plátanos, y ácidos de anillo aromáticos (ácido gálico) entre otros.



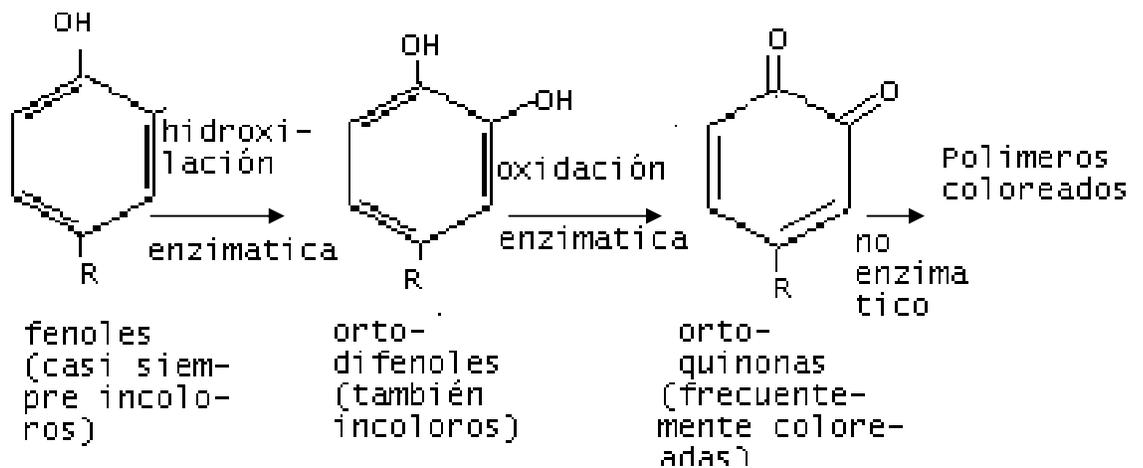
**Figura No. 2** El pirocatecol y sus derivados, sustrato que participa en el proceso de oscurecimiento.

Los cambios bioquímicos involucrados en la maduración se encuentran asociados a la actividad de alguna enzima como la polifenoloxidasas, pectinesterasa, poligalacturonasa y peroxidasa, su acción a nivel de los tejidos varía según el grado de maduración, y da lugar a una serie de características de calidad física y química de importancia, tanto para el fruto fresco como procesado, algunas de esta enzima causan problemas en la apariencia como color, olor, sabor, textura, etc., de las pulpas y por ende en los productos terminados, dando una calidad comercial defectuosa que limita el aprovechamiento integral del producto.

### **2.13.3 MECANISMO DEL PROCESO DE OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO**

Según Corse (1964) y Whitaker (1976), el oscurecimiento ocurre por la acción de una enzima (o múltiples enzimas) que oxidan al catecol a orto-quinonas. Estas polimerizaciones originan compuestos colorados oscuros conocidos como melanodionas.

Las fases de su transformación son las siguientes:



**Figura No. 1** Fases de la transformación enzimática de compuestos fenoles a polímeros coloreados.

En el caso de oscurecimiento enzimático las reacciones son catalizadas por complejos enzimáticos naturales en alimentos que envuelven la formación de pigmentos oscuros, liberación de gases y la reducción del volumen de la fruta (Monsalve, González et al., 1993)

Paralelamente con la alteración del color, se producen los cambios de sabor y las pérdidas de valor nutrimental de estos alimentos, siendo éste uno de los principales problemas de los productos agrícolas después de ser cosechados o durante el procesamiento industrial.

En la prevención del pardeamiento enzimático, se utilizan numerosos, pero por razones de costos, toxicidad, reglamentación o efectos secundarios desfavorables sobre la calidad, en la práctica sólo se utilizan algunos:

- **Selección de variedades en sustratos fenólicos**, fundamentalmente, para evitar contusiones que dañan los tejidos, poniendo así en contacto enzimas y sustratos de pardeamiento.
- **Inactivación a temperaturas**, es efectiva, pero modifica características organolépticas. La refrigeración, congelación y deshidratación, las dos últimas afectan la integridad del tejido vegetal y por tanto favorecen el pardeamiento enzimático.
- **La adición de compuestos reductores**, que transforman las quinonas en fenoles, permite retardar o impedir el pardeamiento enzimático.
- **Inmersión de frutas**, después del pelado y corte, en agua ligeramente salada o en una solución de sacarosa o glucosa, limita la entrada de oxígeno hasta el tejido vegetal y su absorción por este último. La penetración de azúcar en los tejidos los fortalece debido a la presión osmótica; en frutas destinadas a congelación, se utiliza jarabe en un 30-50% de sacarosa por 3 a 7 partes de frutas, ya que el azúcar actúa como protector y mejora la retención del aroma.
- **El descenso del pH**, por lo general se emplea baños de ácido cítrico.
- **Contra la acción de la polifenoloxidasas**, se elimina el oxígeno de los tejidos. La desoxigenación se obtiene por vacío o por borboteo de nitrógeno.

## 2.14 FUNCIÓN Y EXPRESIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA

La clasificación de las enzimas, según describe la comisión IUPAC-IUUP de Biochemical Nomenclature-revised Enzyme Nomenclature 1984, es de acuerdo a la naturaleza de reacciones químicas que catalicen. La polifenoloxidasas pertenece a las oxidoreductasas, ya que contiene cobre como grupo prostético, las cuales incluyen todas las enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción por transferencia de hidrógeno, para producir o-difenoles y la remoción de hidrógenos de los o-difenoles para producir quinonas (Whitaker, 1972); o por la incorporación de oxígeno al sustrato.

Para los fines de control o prevención del oscurecimiento enzimático, es necesario conocer ampliamente las características de la enzima y de las reacciones por ella catalizadas. Sobre todo, es de especial importancia conocer la influencia sobre la actividad de la enzima de factores tales como el pH, temperatura, sustratos, inhibidores, etc.

La enzima se encuentra particularmente en altas concentraciones en champiñones, tubérculos de la papa, duraznos manzanas, cambur, aguacate, hojas de té, café y hojas de tabaco.

#### **2.14.1 Características del enzima.**

La polifenoloxidasas tiene una especificidad de sustrato poco estricta. Esta oxidan los o-fenoles, pero algunas pueden no tener actividad cresolasa. Entre los sustratos monofenol y difenol comúnmente usados, se encuentran el catecol, el 4-metil catecol, la dopamina (3,4-dihidroxifeniletamina), el pirogalol, la catequiza, el ácido cafeico, el ácido clorogénico, el p-cresol, la tirosina y el ácido p-hidroxicinámico.

Los estudios mayormente realizados en polifenoloxidasas es el aislamiento de esta en *Agaricus bisporus* (el champiñón común) y *Neurospora crassa*.

Otros nombres dados a esta enzima son los de fenolasa, fenoloxidasas, tirosinasa, cresolasa, polifenolasa, catecoloxidasas, catecolasa, oxidasas del ácido clorogénico, etc.

La PPO puede oxidar una gran variedad de sustratos fenólicos para producir quinonas. Las *o*-quinonas son precursoras del color café, ellas mismas poseen poco color, sin embargo dan lugar a hidroxiquinonas que se polimerizan y oxidan fácilmente dando, ellas sí, el color café de las frutas. Esta última reacción de oxidación es rápida y no es enzimática.

Las quinonas son compuestos orgánicos muy importantes que proceden de la oxidación de fenoles.

#### **2.14.2 Productos secundarios.**

La importancia de estas enzimas en los alimentos deriva de la formación de quinonas que pueden tomar parte en reacciones secundarias de oxidación, acoplada con otros sustratos, de condensación y polimerización, que causan el pardeamiento en los tejidos vegetales.

Hay algunos compuestos como el ácido ascórbico, los antocianos y muchos otros compuestos fenólicos que reducen la *o*-quinona a difenoles, por lo que los productos que no son directamente oxidados por la enzima son indirectamente, vía reacciones acopladas con la *o*-quinona.

#### **2.14.3 Mecanismo de oxidación.**

Estudios realizados con la cinética enzimática indican que el mecanismo de oxidación de la polifenoloxidasa (PPO) dependen principalmente de tres factores: contenido de oxígeno, tipo de sustrato y condiciones óptimas de actividad de la enzima. En este sentido el pH óptimo oscila entre 6 y 6.5 en presencia de un sustrato rico en compuestos fenolicos, como por ejemplo: los pigmentos antocianicos, catequinas, proantocianidinas, flavonoles y flavonas, grupo más reactivo (Janovitz et al., 1989).

## **2.15 MÉTODOS PARA LA INHIBICIÓN DEL OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO.**

La inhibición de la actividad de las enzimas polifenoloxidasas (PPO) puede conseguirse mediante métodos, entre los que destacan la adición de agentes antioxidantes, ajuste del pH, almacenamiento en atmósfera pobres en oxígeno y tratamientos térmicos. Algunos de estos tratamientos presentan efectos adversos en 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.

A continuación se describen los métodos de utilización de antioxidantes y la aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos para inhibir el proceso de oscurecimiento enzimático.

### **2.15.1 Aplicación de aditivos químicos en la conservación de los alimentos para inhibir el proceso de oscurecimiento enzimático.**

Debido a la oxidación de los alimentos, la industria alimentaria intenta evitarla mediante diferentes técnicas, como el envasado al vacío o en recipientes opacos, pero también utilizando antioxidantes.

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- Deteniendo la reacción en cadena de la oxidación de las grasas.
- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases, el denominado espacio de cabeza.
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Los que actúan por los primeros mecanismos son los antioxidantes propios del alimento, mientras que los que actúan en la tercera forma se agrupan en la denominación legal de “antioxidantes sinérgicos”, o más propiamente, de agentes quelantes, los antioxidantes frenan la reacción de oxidación pero a costa de destruirse a ellos mismos.

El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva.

Los antioxidantes más usados en la industria alimentaria son, el ácido ascórbico, ácido cítrico, m-bisulfito de sodio y otros.

- **El ácido cítrico**, es uno de los aditivos más utilizados por la industria alimentaria. Se obtiene por fermentación de distintas materias primas,

especialmente la melaza de caña de azúcar. En el mercado mundial, cerca del 90% del producto, considerado un commodity, es elaborado por la Unión Europea, Estados Unidos y China. Si bien en la Argentina el consumo alcanza actualmente las 14.500 toneladas, no se registra elaboración en el ámbito nacional. De los países del Mercosur, sólo Brasil produce ácido cítrico, aunque no alcanza a cubrir su demanda interna. Considerando que el precio del producto fabricado en la Argentina se aproximaría al importado, la producción nacional de ácido cítrico contaría con la ventaja de la disponibilidad de materias primas. Constituiría, además, una alternativa para agregar valor al sector azucarero en el marco de una industria alimentaria en permanente expansión en el ámbito del Mercosur.

- **El ácido ascórbico (Vitamina C)**, actúa como catalizador de óxido-reducción en las células. Factor de dieta que debe estar presente en la alimentación humana. Sus propiedades son: cristales blancos, soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, insoluble en éter, cloroformo, éter de petróleo, aceites y grasas; estable en el aire cuando está seco. Se utiliza como: medicina, nutriente, antioxidante y como conservador para alimentos, y es agente reductor en química analítica.

- **El anhídrido sulfuroso.** Es uno de los conservantes con una mayor tradición en su utilización, es un gas, comercializado en forma líquida a presión. Es un aditivo autolimitante en su uso, en el sentido de que por encima de una cierta dosis altera las características gustativas del producto. Es especialmente eficaz en medio ácido, inhibiendo bacterias y mohos, y en menor grado, levaduras. Actúa destruyendo la tiamina (vitamina B1), por lo que no debe usarse en aquellos alimentos que la aporten en una proporción significativa a la dieta, como es el

caso de la carne; sin embargo, protege en cierto grado a la vitamina C. Durante el cocinado o procesado industrial de los alimentos el anhídrido sulfuroso y sulfitos se pierden en parte por evaporación o por combinación con otros componentes.

Los límites legales se expresan siempre en contenido de anhídrido sulfuroso. El anhídrido sulfuroso y los sulfitos son muy utilizados para la conservación de zumos de uva, mostos y vinos, así como para la de la sidra y vinagre.

También se utiliza como conservador en salsas de mostaza y especialmente en los derivados de fruta (zumos, etc.) que van a utilizarse como materia prima para otras industrias, de los que desaparece en su mayor parte durante el procesado posterior.

### **2.15.2 Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos para inhibir el proceso de oscurecimiento enzimático.**

La alta presión hidrostática (APH), es una de las técnicas o métodos para la conservación de los alimentos, y también se le llama pascalización, presurización o simplemente alta presión.

Esta tecnología destaca sobre los procesos térmicos (Knorr, 1993), ya que estos causan pérdida de nutrientes y sabores, se le considera la técnica más viable desde punto de vista comercial, ya que se ha demostrado su efectividad en la inactivación de esporas y enzimas.

La APH, inactiva células microbianas, sin alterar la calidad sensorial ni los nutrientes de los alimentos (Cheftel, 1995).

Ventajas:

- Evita la deformación de los alimentos,
- No produce deterioro de nutrientes termolábil como por ejemplo las vitaminas,
- No altera el sabor natural, ni coloración,
- No produce residuos, se trata de energía limpia,
- No precisa la incorporación de aditivos al alimento.

Desventajas:

- Alto costo del equipo,
- Falta de diseños de procesos continuos,
- Imposibilidad de aplicación en frutas, verduras, porque pierden su forma aspecto original.

## **2.16 INVESTIGACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA EN FRUTOS**

Se han realizado una gran variedad de investigaciones sobre la actividad de la polifenoloxidasa principalmente en frutos. Debido a la especificidad de esta enzima para el sustrato fenólico, se han utilizado métodos de ensayo, en función a esta propiedad tales como métodos espectrofotométricos; los cuales pueden medir la aparición de las o-quinonas (Waite, 1976; Cabanes et al., 1987) y métodos oximétricos (Mayer y Harel, 1979).

La polifenoloxidasa ha sido estudiada en frutos tales como aguacate (Khan, 1985; Laderoza *et al.*, 1980 y Khan, 1977); pera (Rivas y Whitaker, 1973 y Wisseman y Montgomery, 1985); durazno (Paulson y Vanderstoep, 1980 y Wong *et al.*, 1972); cambur manzano (Palmer, 1963 y Rivas, 1978); mango (Thomas y

Janave, 1973). También en espinaca (Sato, 1982) y batata (Tanaka y Uritani, 1977)

La polifenoloxidasas del aguacate fue localizada soluble y atada a la membrana (Mayer y Harel, 1979; Lelyveld et al., 1984). La actividad monofenolasa del aguacate PFO fue detectada por una enzima extraída usando un talco de acetona (Khan y Pomerantz, 1980).

La mayoría de los métodos descritos han sido enfocados a la actividad difenolasa de esta enzima. Para la mayoría de los polifenoles, incluyendo polifenol oxidasas de aguacate, la actividad difenolasa ha sido caracterizada extensamente, (Benjamín y Montgomery, 1973; Khan, 1976a, b; Halim y Montgomery, 1978, Lelyveld et al., 1984; Janovitz – Klapp et al., 1990; Heimdal et., 1994). Sin embargo son pocos los estudios de la actividad monofenolasa (Rodríguez – López al., 1992, 1994; Ros et al., 1994; Espin et al., 1995a, b, 1996a, b,) y solo hay uno en donde es descrita la actividad monofenolasa de la polifenoloxidasas del aguacate (Khan y Pomerantz, 1980).

Esta escasa información acerca de la actividad monofenolasa de polifenol oxidasas del aguacate proviene de la fragilidad de la enzima durante el proceso de purificación (Matheis, 1987). Este fenómeno es bien conocido en otras plantas que contienen PFOS (Mayer y Harel, 1979) al igual que los resultados partir de cambios en la estructura de la proteína durante la purificación (Walter y Purcell, 1980).

La polifenoloxidasas ha sido sujeta a varias críticas (Vamos – Vigázo, 1981; Robb, 1984; Mayer, 1987; Nicolás et al, 1994; Sánchez – Ferrer et al., 1995). La

prevención de esta reacción siempre ha sido puesta a prueba por científicos alimentarios (Matheis, 1987).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Etapas del trabajo de investigación.**

Para el desarrollo de dicha investigación, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. Extracción de la polifenoloxidasas a partir de pulpa de aguacate Criollo.
2. Determinación de las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la reacción (temperatura y concentración de enzima inicial), el espectrofotómetro.

3. Extracción de los compuestos a probar con capacidad inhibitoria de la semilla del aguacate.
4. Seguimiento y evaluación del grado de inhibición, al adicionar inhibidores químicos comúnmente empleados: ácido ascórbico, ácido cítrico y meta bisulfito de sodio.
5. Seguimiento y evaluación del grado de inhibición, por adición al sistema de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate.
6. Comparación de los resultados obtenidos en ambos procesos.

### 3.2 Localización

**Se llevó a cabo en las instalaciones de los Laboratorios de Nutrición y Alimentos, así como en el Laboratorio de Producción Animal, 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  $25^{\circ} 23'$ , una longitud Oeste de  $101^{\circ} 02'$  y una altura de 1743 msnm.**

### 3.3 Material de laboratorio

El material de laboratorio que se utilizó en la realización de este trabajo de investigación, fue proporcionados de los laboratorios anteriormente, los cuales se mencionan a continuación:

Cuadro No 2. Material de laboratorio.

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Cuchillo                             | Probetas 100 ml.  |
| Tabla                                | Matraces Erlenmeyer 200,1000 ml.  |
| Espátula                             | Matraz Kitazato 50 ml.  |
| Tubos de plástico para la centrifuga | Termómetro (100 °C)   |
| Agitadores magnéticos                | Tubos de ensaye   |
| Vasos de precipitado 50,250 ml.      | Pipetas 1 ml.   |
| Gasa                                 | Pisetas   |
| Tela de lino                         | Gradillas   |
| Embudo                               | Micropipetas. <sup>20</sup> / <sub>200</sub> y <sup>200</sup> / <sub>1000</sub> |
| Papel Whatman No.1 y No.5,           | Matraces de aforación 1000 ml.  |

### 3.4 Equipo de laboratorio

Los equipos utilizados en la presente investigación se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro. 3. Equipos de laboratorio utilizados.

| <b>Equipo</b>        | <b>Marca</b>          |
|----------------------|-----------------------|
| Congelador           | America               |
| Licuada              | Philips               |
| Centrifuga           | IEC W.H.Curting & Cu  |
| Bomba de vacio       | Duo seal* Vacuum pump |
| Refrigerador         | Hotpoint              |
| <b>Potenciómetro</b> | <b>Corning</b>        |
| Parrilla Magnética   | Corning               |
| Agitador magnético   | Termolyne             |
| Balanza granataria   | Sauter                |
| Balanza analítica    | A&D                   |
| Vortex               | Genie mixer           |
| Espectrofotómetro    | Genesy                |

### **3.5 Reactivos.**

Buffer fosfato (fosfato sódico monobásico y fosfato sódico bibásico), azul brillante de coomasie, Albúmina, Catecol, agua destilada, NaOH .313 N, HCl .1 N, Acetona, ácido ascórbico, ácido cítrico, m-bisulfito de sodio, etanol y ácido fosforico.

### **3.6 Material Vegetal**

Los aguacates fueron comprados en un centro comercial ubicado en la ciudad de Saltillo; la cantidad de fruto utilizada para dicha investigación fue de aproximadamente 12 kg., los cuales fueron llevados al Laboratorio de Nutrición y Alimentos de la División de Ciencia Animal, para su congelación para su utilización y posterior procesamiento.

## **3.7 EXTRACCIÓN**

### **3.7.1 Extracción de Enzima PPO**

El material fue congelado durante 24 horas posteriormente fue sacado del congelador dejándolo a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de una hora y media, para facilitar la liberación de la enzima de la pulpa por un proceso de deshidrocongelación, después se homogenizó en una licuadora utilizando como medio de extracción, buffer de fosfato 0.1 M, a un Ph 6.9 (por cada 50 gr. de muestra se adicionan 100 ml de buffer) se pasa a una centrifuga donde se mantiene a 3000 rpm durante 45 minutos a temperatura bajas logradas por adición de camas de hielo (se recomiendan velocidades de 32 G., así como de temperaturas óptimas de trabajo de -15°C lo cual no fue posible debido a la carencia de equipo con estas características), de ahí se somete a un filtrado, donde es descartado el precipitado dejando el sobrenadante, el cual representa al extracto crudo que contiene la enzima.

Al extracto crudo se le agregó un volumen doble de acetona fría (-15 °C), posteriormente se pasó a una segunda centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos y el precipitado obtenido que contiene la enzima fue resuspendido en una cantidad de 20ml de buffer de fosfato a un pH 6.9.

### **3.7.2 Extracción de compuestos con actividad inhibitoria de la PPO a partir de semilla**

Se siguió el mismo procedimiento que para la extracción de la PPO a partir de la pulpa (3.7.1).

### **3.8 Ensayo de Actividad Enzimática.**

Se utilizó el método de Pontingy Joslyn (1948), utilizando catecol como sustrato. La mezcla de reacción contenía sustrato, buffer de fosfato 0.1M, a un pH de 6.9 y el extracto enzimático, cuyas concentraciones se variaron. Y se registro mediante un un fotómetro el cambio en absorbancia a 420 nm en función al tiempo, originado al mezclar el sustrato con la enzima, y fue registrado en un espectrofotómetro.

La actividad enzimática se calculó a partir de las pendientes iniciales de las curvas de actividad de los graficas obtenidas, mediante la medición de formación de quinonas indicada por un incremento de absorbancias a 420 nm.

### **3.9 Determinación del Contenido de Proteína**

Se realizó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina de suero de bovino como estándar para la elaboración de la curva patrón, utilizando el reactivo de azul brillante de coomasie, para esta determinación y empleando como blanco para calibrar el espectrofotómetro con 1 ml de agua destilada y 1ml coomasie. Posteriormente se tomo un 1ml de proteína y se le agrego 1ml de reactivo de coomasie, se homogenizo con ayuda del vortex y se toma el tiempo en que el coomasie entra en contacto con la proteína; se dejo reposar 3 minutos y se toma la lectura a 595nm.

### **3.10 Caracterización de las condiciones óptimas para la actividad enzimática.**

#### **3.10.1 Determinación de la concentración de enzima inicial**

La concentración óptima de enzima inicial se determinó por mezclas de reacción como las que fueron utilizadas en los ensayos de actividad, variando la concentración de ésta en un rango 10 a 100  $\mu$ l.

### **3.10.2 Efecto de la temperatura**

La temperatura óptima se determinó por mezclas de reacción como las que fueron utilizadas en los ensayos de actividad, incubadas a diferentes temperaturas. El rango de temperatura estudiada fue entre 15 y 80 °C.

### **3.10.3 Efecto de los inhibidores**

La inhibición de la enzima se estudió utilizando los extractos obtenidos del hueso como inhibidores de origen natural (huecas, hueso), y otros inhibidores químicos como: el meta bisulfito de sodio, el ácido ascórbico y un sinergismo entre ácido ascórbico y cítrico en concentraciones de 40, 50, 120 y 160  $\mu$ M, en todos los casos el sustrato fue catecol, y se utilizó el buffer fosfato 0.1, a un pH de 6.9 como medio para llevar a cabo la reacción. Se determinó la actividad a partir de las pendientes iniciales de las curvas de actividad de las graficas obtenidos, mediante la medición de tasa inicial de formación de quinonas, indicada por un incremento de absorbancias a 420 nm entre la actividad presentada en los sistemas libres de sustancias inhibidoras para obtener los porcentajes de inhibición.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSION**

En el este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el trabajo de investigación enfocado al estudio de los extractos enzimáticos obtenidos del aguacate criollo “*Persea nubigena* L. Wms. variedad *nubigena*”.

El trabajo consta de 3 etapas:

1. Obtención de los extractos
2. Definición de las condiciones óptimas para la máxima expresión de la actividad enzimática
3. Evaluación de inhibidores de la enzima PPO de aguacate criollo “*Persea nubigena* L. Wms var. *nubigena*”.

#### **4.1 Obtención de extractos a partir de las diferentes fracciones del aguacate Criollo *Persea nubigena*. (pulpa, semilla completa y pulpa de la semilla).**

De acuerdo al objetivo planteado en el trabajo se procedió a la precipitación de los extractos de naturaleza proteína a partir de las partes de que consta el fruto, pulpa comestible y semilla.

La extracción se realizó mediante el cambio de actividad acuosa por medio de adición de acetona (Gudarrama, 1990).

Los extractos obtenidos de las diferentes fracciones fueron evaluados mediante la medición de su actividad enzimática expresada en cambio de absorbancia por minuto, detectada a 420

nm. (DAbs/min), y concentración de proteínas. Unidades que fueron utilizadas por Guadarrama,(1990), quien propuso este método para evaluar la enzima de interés. En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de los extractos en cuestión.

En dicho cuadro la actividad de PPO se detecto solo en los extractos obtenidos en la pulpa de aguacate. Los preparados extraídos de la semilla no muestran actividad de PPO aún cuando concentraciones de enzima son detectadas.

También se presenta el valor correspondiente a la actividad específica del extracto, es decir la actividad correspondiente a un gramo de proteína del preparado.

**Cuadro No. 4** Características de los extractos obtenidos a partir de pulpa y semilla de aguacate Criollo.

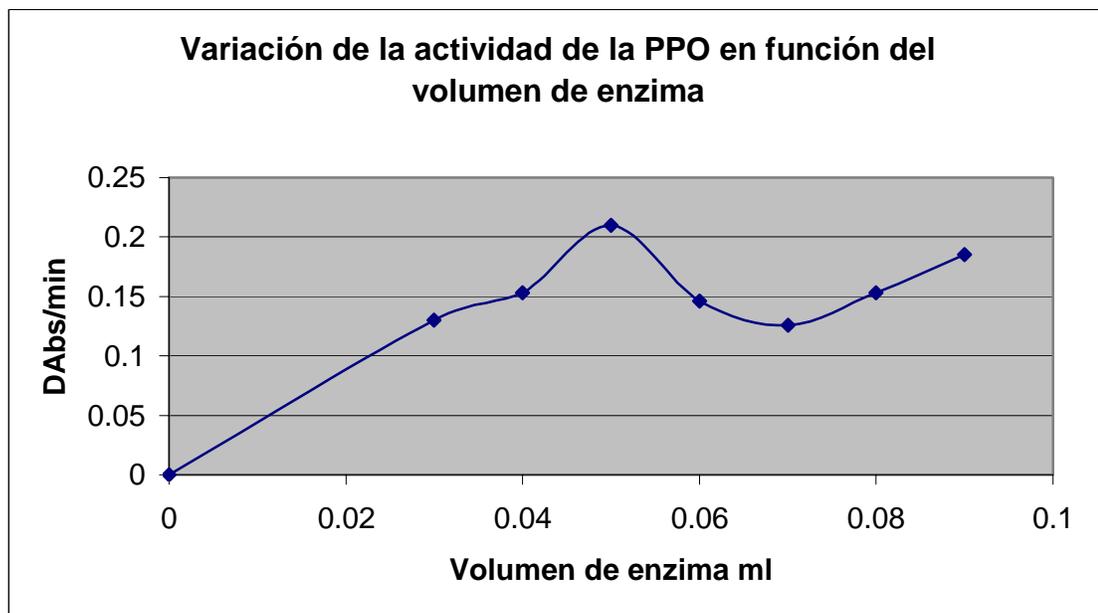
| <b>Muestra</b>              | <b>Actividad,<br/>D Abs/ min.</b> | <b>Concentraciónp<br/>roteína,<br/>mg/ml</b> | <b>Volumen,<br/>Mg/ ml.</b> | <b>Actividad<br/>Específica,<br/>DAbs/min*mg</b> |
|-----------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|--|
| <b>Pulpa<br/>comestible</b> | 0.311                             | 1.65   | 0.050                       | 3.76   |
| <b>Semilla<br/>completa</b> | 0                                 | 0.20   | 0.050                       | 0  |
| <b>Pulpa de<br/>semilla</b> | 0                                 | 0.32   | 0.050                       | 0  |

Cabe mencionar que los extractos obtenidos no son completamente purificados es decir, pueden contener proteínas de diferente especie.

#### **4.2 Seguimiento cinético de la actividad enzimática de los extractos obtenidos a partir de la pulpa de aguacate en función a la concentración del extracto.**

En esta etapa se realizaron diferentes cinéticas de reacción con una variación del volumen inicial de la enzima desde 30 hasta 100  $\mu\text{l}$ ., La actividad se calculó a partir de las pendientes iniciales de las curvas cinéticas de las gráficas obtenidas mediante la medición de la tasa inicial de formación de quinonas indicada por el incremento de las lecturas de absorbancia a 420nm, sin cambiar la concentración de sustrato (50 $\mu\text{l}$  de catecol, 0.01 mM).

Como se puede observar en la figura 3 y el cuadro 5, a medida que la concentración de enzima incrementa, también la actividad se ve incrementada hasta alcanzar un máximo a una concentración de 50  $\mu\text{l}$  que permanece sin cambio después de esta, al utilizar volúmenes mayores en el extracto figura No.3.



**Figura No. 3.** Representación de actividad enzimática en función del volumen de PPO.

**Cuadro No. 5** Actividad de la PPO en función del volumen del preparado enzimático añadido a la mezcla de reacción.

| <b>Volumen añadido de E.<math>\mu\text{l}</math>t.</b> | <b>Con. Relativa de la enzima</b> | <b>Conc. Proteína en la mezcla de rxn mg/ml</b> | <b>Actividad total <math>\Delta</math> A420nm/min</b> |
|--|-----------------------------------|---|---|
|  |                                   |   |   |

|     |           |       |       |
|-----|-----------|-------|-------|
| 30  | $E_0$     | 0.031 | 0.130 |
| 40  | $1.3 E_0$ | 0.042 | 0.153 |
| 50  | $1.7 E_0$ | 0.052 | 0.210 |
| 60  | $2.0 E_0$ | 0.063 | 0.146 |
| 70  | $2.3 E_0$ | 0.073 | 0.126 |
| 80  | $2.7 E_0$ | 0.084 | 0.153 |
| 90  | $3.0 E_0$ | 0.094 | 0.185 |
| 100 | $3.3 E_0$ | 0.105 | 0.132 |

Los resultados obtenidos en este ensayo son de gran relevancia para el proceso enzimático que se estudia. Se observó (figura 3) que la velocidad de la reacción depende de la concentración del enzima (cuadro 5) y la dependencia se describe en una función hiperbólica. Este comportamiento es típico para las enzimas michalianas cuando la concentración de la enzima mucho mayor que la concentración del sustrato.

En estas condiciones ( $E_0 > S_0$ ) la ecuación conocida como ecuación de Michaelis – Menden  $V_0 = \frac{K_{cat} + E_0 S_0}{K_m + S_0}$  según la cual en la velocidad de reacción depende linealmente de la concentración de la enzima no es aplicable.

Según los datos reportados (Klyeser A.A., Buresin I.V. 1979, curso práctico de cinética química y enzimática, Nauta, Moscú Rusia p. 116 – 127), si  $E_0 > S_0$  la velocidad de reacción  $v_0 = \frac{K_{cat} + E_0 S_0}{K_m + E_0}$ . El comportamiento de la figura 3 corresponde a esta ecuación. Lo cual presenta que el proceso es enzimático cuando la concentración de enzima es mayor que la del sustrato.

Tomando como base curva obtenida en la figura 3 para experimentos posteriores se decidió utilizar la concentración de 50 $\mu$ l ya que para estas condiciones, la velocidad de

reacción no varía significativamente al disminuirse o aumentarse la concentración de enzima.

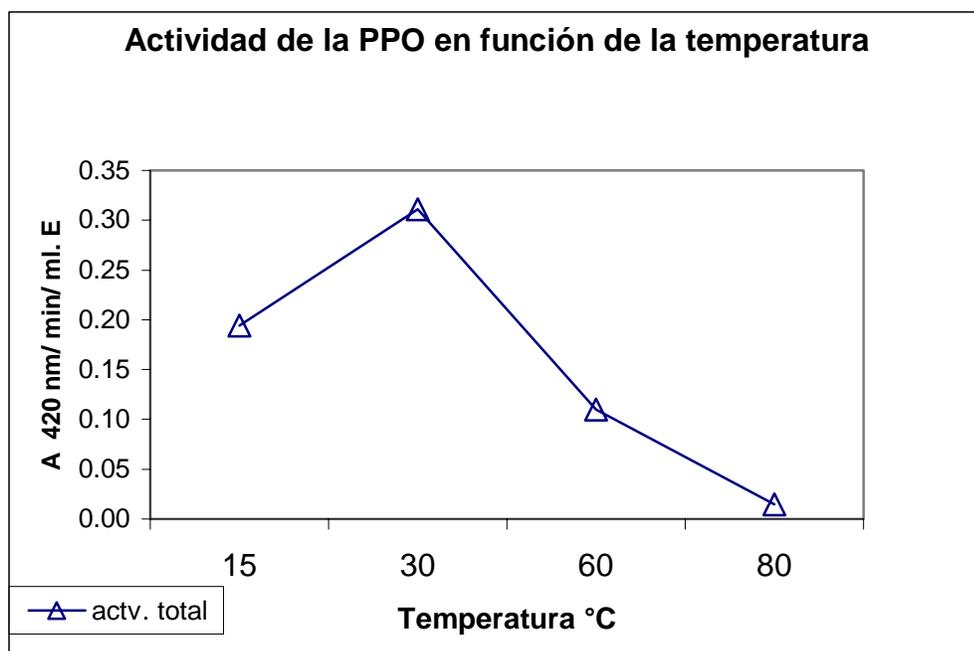
### **4.3 Efecto de la temperatura**

#### **4.3.1 Determinación de la temperatura óptima.**

La temperatura es un factor que ayuda a acelerar la velocidad de las reacciones químicas. Este fenómeno es también presentado en las reacciones catalizadas en las enzimas, solo que al ser estas de naturaleza proteica, enfrentan también el proceso de desnaturalización.

Se llama temperatura óptima, a la temperatura a la cual la actividad catalítica es la máxima, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

Mediante la realización del presente trabajo fue posible establecer que la temperatura óptima, en la cual la actividad de la enzima polifenoloxidasasa de aguacate criollo "*Persea nubigena* L. Wms. var. *nubigena*" es máxima, osciló alrededor de los 30°C, como se aprecia en la figura No. 4 y el cuadro No. 6



**Figura No 4.** Representación de actividad de la PPO en función a la temperatura.

**Cuadro No. 6** Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PPO del aguacate Criollo.

| Temp. ° C | $\Delta$ A420/min |
|-----------|-------------------|
| 15        | 0.194             |
| 30        | 0.311             |
| 60        | 0.110             |
| 80        | 0.015             |

La temperatura óptima de 30°C, la cual es similar a la temperatura óptima reportada para las enzimas PPO obtenidas a partir de otras fuentes vegetales como mango, (Tomas y Janave, 1973), cambur, (Palmer, 1963), ocumo, (Guadarrama, 1990), cambur manzano, (Rivas, 1977). En todas estas investigaciones se obtiene que la temperatura óptima esta dentro del rango de 35 a 45 °C, para dicha enzima, en la cual se encuentra la mayor actividad, produciéndose una disminución a los 60°C, como consecuencia de la desnaturalización de la enzima y perdiéndose casi totalmente a los 80°C.

Para el resto de la investigación se estableció este valor de temperatura óptima como patrón para la evaluación de los subsecuentes parámetros.

#### **4.4 ESTUDIOS DEL PROCESO INHIBITORIO.**

##### **4.4.1 Proceso de inhibición con aditivos químicos.**

Los antioxidantes químicos como el ácido ascórbico, cítrico, m-bisulfito y la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico (50-50) son los más utilizados en la industria, para reducir el oscurecimiento enzimático de las frutas y hortalizas durante su industrialización.

Del cuadro número 7 es posible observar como el grado de inhibición en el proceso de oscurecimiento enzimático es incrementado a medida que la concentración del agente antioxidante es aumentada.

Para dicho efecto el agente que mostró la mayor capacidad para llevar a cabo esta inhibición fue la mezcla sinérgica, presentando un 86.4% de inhibición al ser adicionado en una concentración de 900  $\mu\text{M}$ ., seguido por el ácido cítrico, el ascórbico y finalmente el m-bisulfito de sodio con un 85.3, 73.5 y 61.09% de inhibición respectivamente, al ser adicionados cada uno a la concentración de 900  $\mu\text{M}$ .

Los resultados concordan con los obtenidos a los obtenidos por Nilo Rivas (1977) para la PPO extraída a partir de cambur de manzano, en dicho estudio se demuestran que estas sustancias son fuertes inhibidores de la enzima bajo estudio, pero ocasionan alteraciones en el valor nutrimental del producto.

De las curvas cinéticas obtenidas en esta etapa de estudio se observó la presencia de un período lag lo cual demuestra que en presencia de estos inhibidores alteran el mecanismo de formación de quinonas.

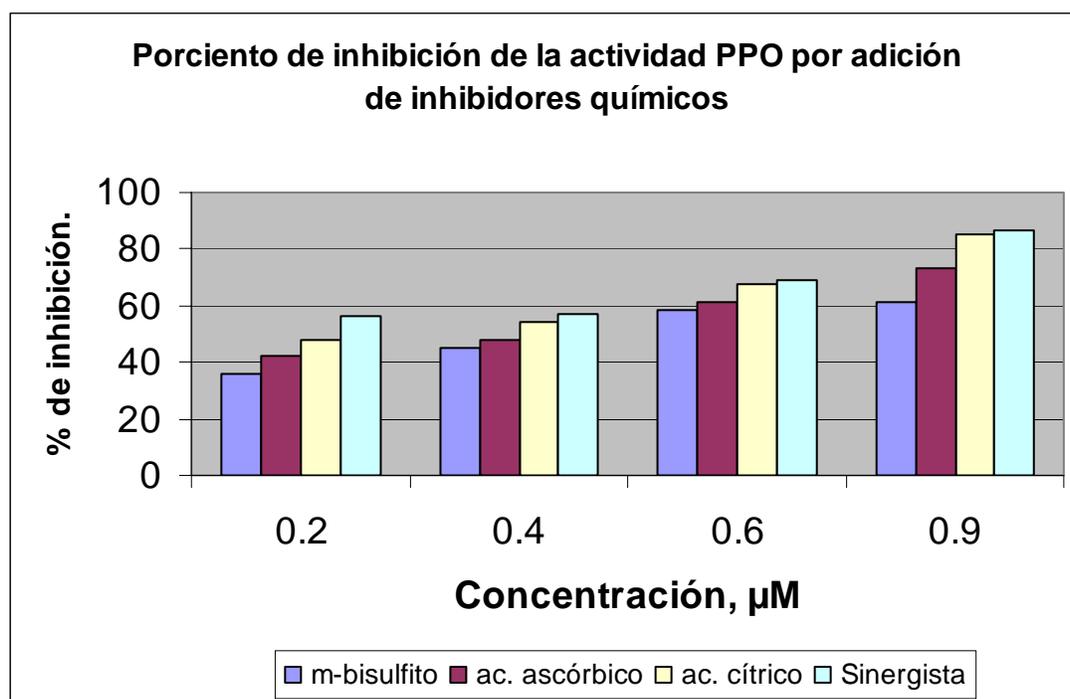
A demás su acción puede estar relacionada con la eliminación del oxígeno o por otro sustrato para la PPO en el medio de reacción, lo cual debe reflejarse en la actividad de la enzima, y puede provocar la aparición de este periodo lag.

También puede deberse a que el ácido cítrico, este actuando como agente quelante que remueven el ión de Cobre que se encuentra en el sitio activo de la enzima PPO, cambiando la conformación de la misma..

**Cuadro No. 7** Efecto de diferentes concentraciones de inhibidores químicos con concentraciones diferentes, sobre la actividad de la PPO del aguacate Criollo.

| <b>Inhibidor</b> | <b>Concentración <math>\mu\text{M}</math></b> | <b>% Inhibición</b> |
|------------------|---|---------------------|
| m-bisulfito      | 200   | 35.691              |
|                  | 400   | 45.338              |
|                  | 600   | 58.199              |
|                  | 900   | 61.093              |
| Ácido Ascórbico  | 200   | 42.122              |
|                  | 400   | 47.910              |
|                  | 600   | 61.093              |
|                  | 900   | 73.500              |
| Ácido Cítrico    | 200   | 47.588              |
|                  | 400   | 54.019              |
|                  | 600   | 67.846              |

|            |     |        |
|------------|-----|--------|
|            | 900 | 85.300 |
| Sinergista | 200 | 56.27  |
|            | 400 | 57.88  |
|            | 600 | 69.10  |
|            | 900 | 86.40  |



**Figura No. 5** Inhibidores químicos a la misma concentración para observar su grado de inhibición.

#### **4.4.2 Proceso de inhibición con adición de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo *Persea nubigena* var. *Nubigena*.**

El motivo principal para la realización de esta prueba se basa en la práctica popular de dejar la semilla de aguacate dentro de la pulpa una vez que es expuesta al ambiente para conservar su color durante un periodo de tiempo más prolongado.

Fue posible obtener extractos de naturaleza proteica provenientes de la semilla de aguacate criollo “*Persea nubigena* LWms variedad nubigena”, como se puede apreciar en el cuadro dos, estos no presentaron actividad característica de PPO, lo cual abrió la oportunidad de probar a estos compuestos como los responsables del retraso en el proceso de oscurecimiento mencionado anteriormente.

Para llevar a cabo la comprobación de dicha hipótesis se sometieron los extractos obtenidos, a partir de la semilla del aguacate, a dos estudios: el primero que consistió en la aplicación en fresco de los extractos a pulpa molida de aguacate. La segunda consistió en la adición de los extractos de la misma forma que los aditivos químicos estudiados en la etapa anterior.

Los resultados fueron los siguientes.

#### **4.4.2.1 Aplicación de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo *Persea nubigena* var. *Nubigena* a pulpa de aguacate en fresco**

Se puede observar en el cuadro No. 8 los resultados de la prueba que se le realizó a la pulpa del aguacate en fresco, donde se presenta el tiempo en que la pulpa molida de aguacate expuesta al oxígeno, presentó la aparición del oscurecimiento enzimático..

Aquí la pulpa (control) a la en cual no se le aplicó el extracto el periodo sin presentar oscurecimiento fue de 15 minutos contra a la que se le aplicaron, con una duración de 5 horas de la pulpa a la cual se aplicó el extracto, es decir la pulpa con los extractos fue 20 veces más resistente a este proceso de oscurecimiento que la pulpa control.

**Cuadro No. 8** Efecto de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate utilizados como inhibidores de la actividad de la PPO del aguacate Criollo “*Persea nubigena* var. *nubigena*” aplicados en fresco.

| Fracción aplicada en pulpa de aguacate.           | Tiempo de aparición de oscurecimiento, min. |
|---|---|
| Control   | 10-15 min.                                  |
| Extractos obtenidos a partir de pulpa de semilla. | 5 hrs.                                      |
| Extractos obtenidos a partir de semilla completa. | 5 hrs.                                      |

#### **4.4.3 Seguimiento espectrofotométrico de la inhibición de la actividad enzimática de la PPO con adición de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo *Persea nubigena* var. *Nubigena*.**

Después de demostrar que la actividad del preparado enzimático obtenido a partir de pulpa de aguacate criollo es inhibida con los compuestos químicos, conocidos como inhibidores de la PPO, se procedió a realizar el estudio de evaluación de la actividad de la enzima de interés en presencia de los extractos obtenidos a partir de semilla completa y de pulpa de la semilla del fruto de la misma especie.

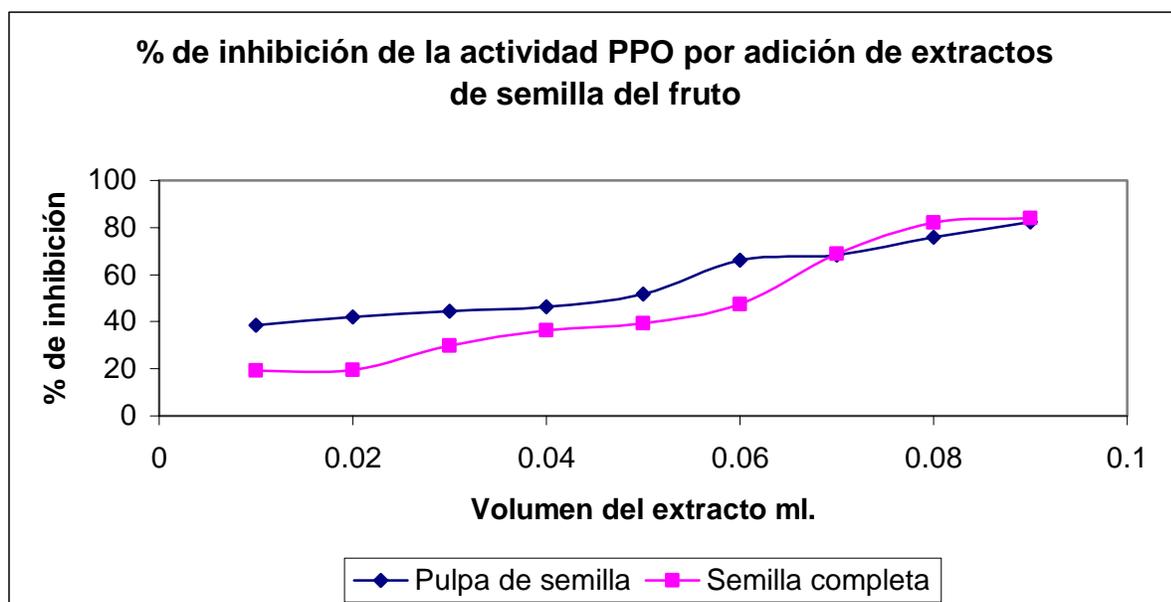
Las características de los preparados extraídos (en tanto a la concentración de proteína), se presentaron en el cuadro 8. como la concentración inicial de lo(s) inhibidor(es) en el extractos es desconocida, el estudio se realizó aplicando diferentes volúmenes de las muestra en cuestión, considerando que estos permiten variar su concentración mientras que el volumen final de la mezcla de reacción permanece constante. Los resultados obtenidos en el presente ensayo se presentan en el cuadro 9 y figura 6.

Los resultados obtenidos demuestran que la semilla de aguacate puede ser utilizada como fuente de compuestos inhibidores que pueden ser utilizados para prevenir del proceso oscurecimiento enzimático de este fruto.

Desafortunadamente, no fue posible encontrar datos de literatura de otros estudios similares al realizado en el presente trabajo de investigación.

**Cuadro No. 9.** Efecto de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate utilizados como inhibidores de la actividad de la PPO del aguacate criollo.

| <b>Concentraciones <math>\mu</math>l</b> | <b>Concentración relativa</b> | <b>% de inhibición con extractos de semilla completa</b> | <b>% de inhibición de extractos de pulpa de semillas</b> |
|--|-------------------------------|--|--|
| 10                                       | $I_0$                         | 19.212   | 38.585   |
| 20                                       | 2 $I_0$                       | 19.458   | 42.122   |
| 30                                       | 3 $I_0$                       | 29.803   | 44.373   |
| 40                                       | 4 $I_0$                       | 36.207   | 46.302   |
| 50                                       | 5 $I_0$                       | 39.409   | 51.768   |
| 60                                       | 6 $I_0$                       | 47.291   | 66.238   |
| 70                                       | 7 $I_0$                       | 68.966   | 68.167   |
| 80                                       | 8 $I_0$                       | 82.020   | 75.884   |
| 90                                       | 9 $I_0$                       | 83.990   | 82.315   |



**Figura No. 6** Extractos de aguacate criollo con efecto inhibitorio.

En el cuadro 9 se observa como el grado de inhibición en el proceso de oscurecimiento enzimático es incrementa a medida que la concentración del extracto inhibitorio es aumentada.

En este caso la inhibición por medio de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate criollo "*Persea nubigena* L. Wms var. *nubigena*", presenta una gran similitud en los dos extractos (pulpa de semilla y semilla sola), como se puede observar en la figura 6, ya que al inicio se ve como la semilla completa inhibe mas que la pulpa, obteniendo el máximo grado de inhibición al adicionar un volumen de 90  $\mu$ l, obteniéndose así un porcentaje de inhibición del 83.99 y 82.35 para la semilla completa y la pulpa de la semilla respectivamente, valores que se pueden considerar relativamente similares.

Por tanto es factible pensar que la fracción realmente responsable del proceso inhibitorio es la pulpa, ya que es el componente mayoritario en las dos fraccion.

Comparando con el grado de inhibición presentado con los inhibidores de tipo químicos y los extractos de pulpa de semilla y semilla completa es posible proponer que a estos extractos como agentes para retardar el proceso de oscurecimiento enzimático para este fruto, ya que los niveles de inhibición alcanzados al adicionar los extractos son similares a los alcanzados por los inhibidores químicos que dieron mejores resultados, fueron la mezcla sinérgica con un 86.4% y el ácido cítrico con un 85.3% de inhibición, en concentración de 900  $\mu\text{M}$  contra el 83.9% presentado por la adición del extracto de la semilla completa, en un volumen de 90  $\mu\text{l}$

Estos a la vez fueron superiores a los niveles inhibitorios causados por adición del m-bisulfito de sodio, el cual solo alcanzó un 61.09% de inhibición a una concentración de 900m.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES.**

- A partir de pulpa de aguacate se logró obtener un extracto enigmático con actividad de PPO.
- En el estudio de las cinéticas de reacción de oxidación del catecol en presencia de diferentes concentraciones de extracto de pulpa de aguacate Criollo se observó el comportamiento que comprueba que el proceso estudiado es mediado por presencia de la enzima PPO, ya que la gráfica construida a partir de los datos obtenidos presenta un comportamiento típico de una enzima Michaeliana.
- Se concluyó que la temperatura óptima para la reacción catalizada por PPO de pulpa de aguacate Criollo se encuentra cercana a los 30 °C. a temperaturas superiores a la anteriormente mencionada se observó decremento en la actividad, conservando 4.82% a temperatura de 80°C llegando a un valor nulo a temperaturas superiores a 90°C.
- En el ensayo enzimático se observó que la PPO de aguacate Criollo responsable del proceso de oscurecimiento enzimático es inhibida con compuestos químicos tales como el ácido ascórbico, m-bisulfito de sodio, ácido cítrico y la mezcla ácido cítrico-ascórbico (50-50).

- El mayor porcentaje de inhibición se observó en presencia de 900  $\mu\text{M}$  de la mezcla sinérgica, presentando un 86.4% de inhibición, seguido por el ácido cítrico, el ascórbico y finalmente el m-bisulfito de sodio con un 85.3, 73.5 y 61.09% de inhibición respectivamente
  - A partir de semilla completa y de pulpa de la misma fue posible obtener extractos con actividad inhibitoria sobre la enzima PPO de la pulpa de aguacate Criollo.
- Se observó que los extractos de pulpa de semilla y de semilla completa de aguacate Criollo provocan un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PPO obteniéndose un porcentaje de inhibición del 83.99 y 82.35 para la semilla completa y la pulpa de la semilla respectivamente, valores que se pueden considerar relativamente similares, al ser adicionados en volúmenes de 90  $\mu\text{l}$ .
- La similitud en los efectos inhibitorios observados en presencia del extracto de pulpa y el de semilla completa permiten proponer que los componentes responsables de la inhibición se encuentran en la pulpa ya que este es el componente mayoritario.
- En estudios en fresco se demostró que la aplicación de extractos de pulpa y de semilla completa permite retardar el proceso de oscurecimiento por un periodo de 5 horas que es 18 veces mayor que en el control sin adición de extractos, sometidos a condiciones de exposición al medio ambiente con oxígeno extremas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida, M. E. M., y Nogueira, J. N. 1995. The control of polyphenol oxidase in fruits and vegetables. *Plants Foods for Human Nutrition*, 47, 245–256.
2. Avallone, C. M., Cravzov, A. L., Montenegro, S. B., Pellizzari, E. Estudio de la actividad de polifeniloxidasas y peroxidasas en *Carica papaya L.* minimamente procesada. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2000.
3. Benjamin, N. D.; Montgomery, M. W. Polyphenol oxidase of Royal Ann cherries: purification and characterization. *J. Food Sci.* 1973, 38, 779-806.
4. Brom, R. E. El aguacate. 1970. México, D. F. Enero 1970.
5. Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 914, 190- 197.
6. Cheftel; C.J.1976.introduccion a la tecnología de los alimentos. Edit. Acribia.vol 1.
7. 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.

8. Corse, J., 1964 Te enzymatic browning of fruits and vegetables. In: Runeckles, V. C., ed. *Phenotic in Normal and Diseased fruitand vegetables*. Montreal. Imperial Tabacco Co., p.41-62.
9. Eskin, N.A.M.; Henderson & R. J. Townsend, 1971. *Biochemistry of foods*. London, Academic Press. 239 p.
10. Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García- Cánovas, F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Verdedoncella apple. *J. Agric. Food Chem.* 1995b, *43*, 2807-2812.
11. Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García- Cánovas, F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* 1995a, *231*, 237-246.
12. Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García- Cánovas, F. Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 1996a, *61* (6), 1177- 1181.
13. Fersini, A. *El Cultivo del Aguacate* (Avocado production); Editorial Diana: México City, 1975.
14. Gómez, L. V. M . Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chemistry* 77 (2002) 163–169
15. Gomez, R. F.; Bates, R. P. Storage deterioration of freeze-dried avocado puree and guacamole. *J. Food Sci.* 1970, *35*, 472- 475.
16. Guadarrama, A; N. Rivas. 1990. Purificación y caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasasa del ocumo (*Xanthosoma sagittifolium* ). *Revista de la Facultad de Agronomía* .16 : 65 - 68.
17. Halim, D. H.; Montgomery, M. W. Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (*Pyrus communis* L.). *J. Food Sci.* 1978, *43*, 603-608.

18. Kahn, V. (1975). Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, 1319–1324.
19. Kertesz, D. and R. Zito 1957: Polyphenoloxidase purification and molecular properties. *Nature*. London, 179:1017-1018.
20. Khan, V. (1976a). Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. *Phytochemistry*, 15, 267–272.
21. Khan, V. (1976b). Effect of some phenolic compounds on the oxidation of 4-methyl catechol catalyzed by avocado polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 41, 1011–1012.
22. Khan, V. 1977. 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzate and amino acids on o-hydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom and avocado. *J. Food. Sc.* 50:111-115.
23. Laderoza, M., L.S. Draetta y M. Padula. 1980. Polyphenol oxidase of the pulp of two varieties of avocado. *Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. En *FSTA*, 14(1). 1982.
24. Lax A.R., K.C. Vaughn & G.E. Templeton. 1984. Nuclear inheritance of polyphenol oxidase in *Nicotiana*. *J. Hered.* 75: 285-287.
25. Lelyveld, L. J. V.; Gerrish, C.; Dixon, R. A. Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discoloration of avocado fruit. *Phytochemistry* 1984, 23, 1531-1534.
26. Lime, B. J. Preparation and storage studies of freeze-dried avocado salad. *Food Technol.* 1969a, 23, 317-320.

27. 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.
28. Mason, H. Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* 1955, 16, 105-184.
29. Matheis, G. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*) I. Properties of potato polyphenol oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol.Lebensm.* 1987,11,5-12.
30. Mathew, A G. y H.A. Parpia.1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research* 19:75-145.
31. Mayer, A. M., and Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, 193–215.
32. Mayer,A.M. Polyphenol oxidases in plants. *Recent progress phytochemistry* 1987,26,11-20.
33. McEvily, A. J.; Iyengar, R.; Otwell, W. S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992, 32, 253-273.
34. Nicolas, J. J.; Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Amiot, M. J.; Aubert, S. Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1994, 34, 109-157.
35. Palmer, J.K 1963. Banana polyphenol oxidase: preparation and properties. *Plant Physiol.* 38:508-513.
36. Paschoalino, J. E.,1978. Aspectos sobre o escurecimento do palmito durante o procesamento. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos.* Campinas, 56:175-181.

37. Prota, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* 1988, 8, 525-556.
38. Quintanar, A. F. El aguacate.
39. Rivas, N. 1978. Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenoloxidasas del cambur manzano (*Musa [AAB] cv. 'manzano'*). *Revista de Facultad de Agronomía*, IX (4): 39-49.
40. Robb, D. A. Tyrosinase. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*; Lontie, R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1984; Vol II, pp 207-240.
41. Robert, C. Solova F. Martinez P. Modelización del pardeamiento y actividad polifenoloxidasas de aguacate minimamente procesado. Departament de tecnologia de aliments, Universiada de Lleida. España.
42. Robinson S.P. & I.B. Dry. 1992. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* 99: 317-323.
43. Rodríguez, S. T. 1982. El aguacate. Primera Edición.
44. Rodríguez-López, J. N.; Escribano, J.; García-Cánovas, F. A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal. Biochem.* 1994, 216, 205-212.
45. Rodríguez-López, J. N.; Tudela, J.; Varón, R.; García-Carmona, F. and García-Cánovas, F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 3801-3810.
46. Sato, M. 1982. Multiplicity of spinach root phenolase and its monophenolase activity. *Phytochemistry* 21:1229-1231.
47. Sánchez - Ferrer, A.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1247, 1-11.

48. Sánchez, M. I. Producción y Consumo de Aguacate en México. Monografía Profesional.UAAAN. Buenavista, saltillo, Coahuila, México. (2000).
49. Scudomore-Smith, P. D. The utilization of avocado as frozen savoury spread. *Food Technol. Aust.* 1984, 36, 375-378.
50. 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.
51. Solares, M.1976. Cultivo Moderno y Rentable del Aguacate. Editores Unidos Mexicanos S.A. Primera Edición. México, D.F.
52. Swisher, H. E. Avocado oil from food use to skin care. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988, 65, 1704-1706.
53. Teliz, D. 2000. El aguacate y manejo integrado. Ediciones Mundi – Prensa. Primera edición.
54. Tropico # 1.Boletín mensual. 1999.aguacate un producto con potencial comercial. Centro de servicios al sector hortofrutícola region de occidente.
55. Vámos-Vigyázó , L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, 49–127.
56. Van Lelyveld, L. J., Gerrish, C., & Dixon, R. A. (1984). Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discoloration of avocado fruit. *Phytochemistry*, 23, 1531–1534.
57. Vaughn K.C., A.R. Lax & S.O. Duke. 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
58. Vega-Mercado, H.; Martín, O. Monsalve-González, A. y Barbosa-Cánovas, G.V. Cambios físico-químicos que ocurren durante el procesado y almacenamiento de alimentos conservados por factores combinados, SPUPV – 95.2051, 1994.

59. Waite, J. H. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced *o*-quinones. *Anal Biochem.* 1976, 75, 211- 218.
60. Walter, W. M. J.; Purcell, A. E. Effect of substrate levels and polyphenol oxidase activity on darkening in sweet potato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 941-944.
61. Weemaes, A.C., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., y Hendrickx, M.E. Effect of pH on Pressure and Thermal Inactivation of Avocado Polyphenol Oxidase: A Kinetic Study. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 2785-2792.
62. Weemaes, C. A., Ludikhuyze, L. R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M. E., & Tobback, P. P. (1998). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 31, 44–49.
63. Whitaker, J.R. 1972. Principles of enzymology for the food science. New York. Marcell Dekker, Inc. 636 p.
64. Wisseman, KW. y M.W. Montgomery. 1985. Purification of d'Anjou pear (*Pirus communis*) polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 78:256-262.
65. Wong. T., B.S. Luh y J.R. Whitaker. 1972. Effect of fluoroglucinol and resorcinol on the clingstone peach polyphenol oxidase - catalyzed oxidation of 4-methylcatechol. *Plant Physiol.* 48:2430.