

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO



DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Purificación y Caracterización Cinética de la Enzima Polifenoloxidasa de
Aguacate Hass ("*Persea americana*", Variedad "*Mill*") y del Compuesto
Inhibitorio Presente en la Semilla del Mismo.

Por:
JUAN MIGUEL GALLARDO SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Noviembre de 2003

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Purificación y Caracterización Cinética de la Enzima Polifenoloxidasa de
Aguacate Hass ("*Persea americana*", Variedad "*Mill*") y del Compuesto
Inhibitorio Presente en la Semilla del Mismo.

TESIS

Presentada por:
JUAN MIGUEL GALLARDO SÁNCHEZ

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como Requisito
Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

M. C. María Hernández González
Asesor principal

M. C. Xochitl Rúelas Chacón
Vocal

M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla
Vocal

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Suplente

M.C. Ramón García Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Noviembre de 2003

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater** por abrirme las puertas y por haber contribuido a mi formación como ingeniero.

Al **M. C. María Hernández González** por el apoyo que durante la presente investigación me brindo.

Al **M. C. Xochitl Rúelas Chacón** por el valioso apoyo brindado a este trabajo.

Al **M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla** por su valioso apoyo brindado a este trabajo.

Al **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara**, por su valiosa cooperación en el laboratorio durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al **M. C. Rosalinda Mendoza Villarreal** por el apoyo que me brindo para el desarrollo de este trabajo.

Al **T. L. Q. Carlos Alberto Arévalos Sanmiguel** por su valiosa cooperación en el laboratorio durante la realización de este trabajo.

Al **T. L. Q. María de Jesús Sánchez Velásquez** por todo el apoyo que me brindo en su laboratorio durante la realización de este trabajo.

Al **T. L. Q. Dora Elia Guevara** por el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este trabajo.

A **mis maestros** que durante mi estancia en la universidad contribuyeron a mi formación como ingeniero.

A **mis compañeros** de clase por todos los momentos compartidos durante nuestra estancia en la universidad.

DEDICATORIAS

A **Dios**, porque día a día está conmigo como una guía y por permitirme llegar a mi meta.

A mis papás: **Sabino Gallardo Robalo y Avelina Lioncia Sánchez Martínez** por darme la mejor herencia que un padre puede dejar a sus hijos. Los quiero mucho.

A mis hermanos: **Magdalena Gallardo Sánchez, Bárbara Gallardo Sánchez, Elfego Gallardo Sánchez, Gregorio Sabino Gallardo Sánchez, Gabriela Gallardo Sánchez;** los quiero mucho y gracias por apoyarme en todo momento que los necesito.

A mis cuñados: **Héctor Hernández Delgado, José León Muñoz, Norma Mercado Sarabia,** por el apoyo que me brindan cuando los he necesitado.

A mis sobrinos a los que quiero mucho: **Miriam Hernández Gallardo, Daniel Orozco Hernández, Dante Hernández Gallardo, Carlo Hernández Gallardo, Jessica León Gallardo, Matildita León Gallardo, Jorge Gallardo Mercado, Liseth Gallardo Mercado, Héctor Gallardo Mercado.**

Al amor de mi vida, Martha Lilia Meléndez Estrada, por todos los bellos y no tan bellos momentos que juntos pasamos y por todo el apoyo que incondicionalmente recibo de ella, impulsándome a lograr mis metas. Te amo.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Acción de la polifenoloxidasasa sobre los compuestos fenólicos.....	13
Figura 2: Oxidación del catecol.....	19
Figura 3: Purificación por diálisis.....	38
Figura 4: Cromatografía de intercambio iónico.....	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Purificación parcial de la enzima polifenoloxidasasa con diferentes solventes.....	46
Cuadro 2: Porcentaje de inhibición de la obtenida con silicagel.....	48
Cuadro 3: Porcentaje de inhibición de la fracción obtenida con resina Dowex-50.....	48
Cuadro 4: Datos de K_M y $V_{m\acute{a}x}$	49

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.....	24
Gráfica 2: Representación (Lineweaver-Burk), doble recíproca.....	25
Gráfica 3: Representación de Eadie-Hofstee.....	26
Gráfica 4: Representación doble recíproca que muestra el efecto de la inhibición competitiva.....	29
Gráfica 5: Representación doble recíproca que muestra el efecto de la inhibición acompetitiva.....	30
Gráfica 6: Representación doble recíproca que muestra el efecto de la inhibición no competitiva.....	32
Gráfica 7: Efecto de la concentración de sustrato sobre la enzima polifenoloxidasa. Silicagel.....	46
Gráfica 8: Efecto de la concentración de sustrato sobre la enzima polifenoloxidasa. Dowex-50.....	47
Gráfica 9: Inhibición acompetitiva.....	50
Gráfica 10: Constante de inhibición.....	50

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

PPO: Polifenoloxidasa.

V_0 : Velocidad inicial.

$V_{m\acute{a}x}$: Velocidad máxima.

K_M : Constante de Michaelis.

K_i : Constante de inhibición.

EC 1.14.18.1: Número asignado a la enzima polifenoloxidasa según la comisión internacional de enzimas.

D: Dalton.

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social.

FDA: Dirección de Alimentos y Medicamentos.

nm: nanometros.

rpm: Revoluciones por minuto.

INDICE GENERAL

Agradecimientos.....	i
Dedicatorias.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Índice de cuadros.....	iii
Índice de gráficas.....	iv
Abreviaciones y símbolos.....	v
Capitulo 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos.....	5
Capitulo 2	
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Tipos de Oscurecimiento en Alimentos.....	7
2.1.1. Pardeamiento No Enzimático de Alimentos.....	7
2.1.2. Pardeamiento Enzimático de Alimentos.....	8
2.1.2.1. Enzimas.....	8
2.1.2.2. Nomenclatura.....	9
2.1.2.3. Clasificación de las Enzimas.....	10
2.1.3. Polifenoloxidasas.....	11
2.1.3.1. Características de la Enzima Polifenoloxidasas.....	11
2.1.3.2. Mecanismo de Reacción de la Polifenoloxidasas.....	12
2.1.3.3. Importancia de la Polifenoloxidasas.....	13
2.1.3.4. Investigaciones acerca del Estudio de la Polifenoloxidasas.....	14
2.1.4. Acción de los Polifenoles en los Vegetales.....	15
2.2. El Aguacate.....	15
2.2.1. Importancia Económica.....	16
2.2.1.1. Importancia Mundial.....	17

2.2.1.2. Importancia del Aguacate en México.....	17
2.2.2. Conservación del Aguacate.....	17
2.2.3. Oscurecimiento del Aguacate.....	18
2.2.4. Productos Secundarios de Formación.....	20
2.2.5. Control del Pardeamiento Enzimático.....	21
2.3. Cinética Enzimática.....	23
2.3.1. Transformaciones de la Ecuación de Michaelis-Menten.....	24
2.3.2. Inhibición Enzimática.....	26
2.3.3. Tipos de Inhibición.....	27
2.3.3.1. Inhibición Competitiva.....	27
2.3.3.2. Inhibición Acompetitiva.....	29
2.3.3.3. Inhibición No Competitiva.....	30
CAPITULO 3	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Etapas de la Investigación.....	33
3.2. Localización.....	34
3.3. Material y Equipo.....	34
3.3.1. Materiales Empleados en el trabajo.....	34
3.3.2. Equipos de Laboratorio.....	35
3.3.3. Reactivos.....	35
3.4. Material Vegetal.....	36
3.5. Extracciones.....	36
3.5.1. Extracción de Enzima Polifenoloxidasa.....	36
3.5.2. Extracción de Compuestos con Capacidad Inhibitoria a Partir de Semilla de Aguacate.....	37
3.6. Purificación de Extractos Enzimáticos.....	37
3.6.1. Purificación por Diálisis.....	37
3.6.2. Cromatografía en Columna.....	39
3.6.2.1. Preparación de la Columna con Resina para Cromatografía de Intercambio Iónico Dowex-50.....	39
3.6.2.2. Obtención de Fracciones.....	39

3.6.2.3. Cromatografía en Columna con Silicagel.....	40
3.7. Técnica Cinética de Reacción de la Polifenoloxidasa sin Inhibidor.....	41
3.8. Determinación del Contenido de Proteína.....	41
3.9. Caracterización de las Condiciones Óptimas para la Actividad Enzimática.....	42
3.9.1. Estudio de la Variación de la Actividad Enzimática en Función de la Concentración de Sustrato.....	42
3.9.2. Efecto de los Extractos con Capacidad Inhibitoria a Partir de la Semilla de Aguacate Hass <i>Persea Americana</i> , Variedad <i>Mill</i>	42
CAPITULO 4	
RESULTADOS.....	44
4.1. Etapa 1 Precipitación con Acetona.....	44
4.2 Etapa 2 Purificación de la Enzima Polifenoloxidasa por Cromatografía en Columna con Resina Dowex-50 y Silicagel en Gránulos.....	44
4.3 Etapa 3 Determinación de parámetros Cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la Enzima Polifenoloxidasa.....	46
4.4. Etapa 4 Extracción y Aplicación de la Fracción con Capacidad Inhibitoria a partir de Semilla de Aguacate.....	47
4.4.1. Porcentaje de Inhibición.....	48
4.5. Etapa 5 Tipo de Inhibición.....	49
4.5.1. Determinación de la Constante de Inhibición (K_i).....	50
CAPITULO 5	
CONCLUSIONES.....	51
5.1 Etapa 1 Precipitación con Acetona.....	51
5.2. Etapa 2 Purificación de la Enzima Polifenoloxidasa por Cromatografía en Columna con Resina Dowex-50 y Silicagel en Gránulos.....	51
5.3. Etapa 3 Determinación de Parámetros Cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la Enzima Polifenoloxidasa.....	52
5.4. Etapa 4 Extracción y Aplicación de la Fracción con Capacidad Inhibitoria a Partir de Semilla de Aguacate.....	52
5.5 Etapa 5 Tipo de Inhibición.....	53
5.5.1. Constante de Inhibición (K_i).....	53

CAPITULO 6	
LITERATURA CITADA.....	54
APENDICE.....	62

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *Mill*), es un miembro de la antigua y numerosa familia vegetal de las Lauráceas, con una gran importancia económica en los mercados internacionales por ser un cultivo en expansión, ya que su fruto ha demostrado tener propiedades alimenticias muy valiosas entre las que destacan su alta concentración de proteínas y aceites insaturados.

Dado sus características de productividad, calidad (en su contenido nutricional) y resistencia para el manejo comercial, ha llegado a ser el más importante a nivel nacional.

El oscurecimiento o pardeamiento enzimático constituye uno de los principales problemas durante la conservación y el procesamiento industrial de algunas frutas y hortalizas, tal es el caso del aguacate que en su conservación por periodos de tiempo largos presenta un proceso de oscurecimiento de tipo enzimático (Sánchez, 2000). Este proceso indeseable es debido a la oxidación de compuestos fenólicos, en reacción catalizada por la enzima polifenoloxidasas (PPO, EC 1. 14. 18. 1), que pertenece al grupo de las oxidoreductasas y es responsable de causar pardeamiento en frutas y hortalizas minimamente procesadas (Mayer y Harel, 1979; Wiley, 1997).

La actividad de la polifenoloxidasas consiste básicamente en catalizar dos reacciones en cadena en presencia de oxígeno: primero, tiene lugar la

hidroxilación de monofenoles a difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y posteriormente, los difenoles formados se transforman en quinonas (actividad *o*-difenolasas o catecolasas). El primer producto de la oxidación enzimática son las *o*-quinonas (Nicolás et al, 1994).

Las reacciones de pardeamiento progresan en una segunda fase no enzimática a partir de las quinonas formadas, dando lugar a polímeros de alto peso molecular con diversas coloraciones, denominados melaninas, dependiendo de los sustratos fenólicos que los originaron y del pH (Mc Evily, 1992).

Para que la enzima actúe, es necesaria la presencia de cobre (Cu^+) en el centro activo de la enzima; estado en el que la enzima puede ligar oxígeno. La formación de complejos de cobre da lugar a una inhibición de su actividad.

El pardeamiento enzimático requiere por tanto la disponibilidad de cuatro componentes esenciales: oxígeno, enzima, cobre y sustratos apropiados. Estos factores determinan la velocidad del pardeamiento, que puede tener lugar rápidamente, incluso en pocos minutos.

De lo anterior surge la importancia de definir los parámetros sobre los cuales actúa la enzima polifenoloxidasas presente en el aguacate (pulpa), y elucidar los mecanismos de acción inhibitoria de la semilla del mismo, sin afectar las propiedades nutritivas y organolépticas, que con otros métodos se ven afectadas como es la adición de compuestos químicos como: el ácido

ascórbico, el ácido cítrico y los sulfitos, los cuales actúan solo por periodos cortos y afectan el sabor característico del producto.

Este trabajo tuvo como finalidad principal la caracterización de la enzima polifenoloxidasasa así como también elucidar el mecanismo de inhibición presentado al utilizar la semilla del mismo fruto como inhibidor en los procesos bioquímicos de oscurecimiento enzimático.

1.1 JUSTIFICACIÓN

El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *Mill*), es un fruto que a nivel mundial está tomando gran importancia para los mercados extranjeros. Y México no es la excepción, para el consumidor es un fruto muypreciado por su sabor y por la diversidad de formas en las que puede ser consumido (ensaladas, postres, bebidas, etc.), sin embargo su consumo se ve limitado ya que no hay productos procesados a partir de este, y la vida de anaquel del producto es muy corta debido a que sufre reacciones de tipo bioquímico, tal es el caso del oscurecimiento enzimático, que limita su comercialización en forma procesada ocasionando que su consumo sea en fresco principalmente. Este problema de oscurecimiento enzimático es activado por malos manejos que se le dan al producto durante su almacenamiento y otras operaciones de post- cosecha.

Este trabajo tuvo como meta alcanzar la caracterización de la enzima polifenoloxidasa (presente en la pulpa de aguacate), así como la purificación y caracterización de los extractos con actividad inhibitoria contenidos en la semilla de aguacate. Con la finalidad de utilizar un conservador de origen natural (propio ya que esta contenido en el mismo fruto), que sea capaz de retardar los efectos de oscurecimiento enzimático en el fruto de aguacate, sin alterar en forma significativa sus características organolépticas, que contribuya a alargar la vida de anaquel y que haga posible labores de procesamiento.

Cabe señalar que para la extracción de los extractos con capacidad inhibitoria (semilla de aguacate), se utilizo material que regularmente es

desechado, haciendo con esto que la semilla de aguacate sea aprovechable y deje de considerarse como desecho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Extracción, purificación de la enzima polifenoloxidasa (obtenida de la pulpa de aguacate) y caracterización de los parámetros cinéticos, así como de los compuestos con capacidad inhibitoria del proceso de oscurecimiento enzimático en aguacate, a partir de extractos (presentes en la semilla).

1.2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Extracción de la enzima polifenoloxidasa presente en la pulpa de aguacate *Hass* (*Persea americana*, variedad *Mill*).
- ❖ Extracción de compuestos, con capacidad inhibitoria del proceso de oscurecimiento enzimático, presentes en la semilla de aguacate *Hass* (*Persea americana*, variedad *Mill*).
- ❖ Purificación del extracto por diálisis.
- ❖ Purificación de los extractos por métodos cromatográficos utilizando diversos soportes y solventes para la obtención de las fracciones.
- ❖ Seguimiento espectrofotométrico de la reacción enzimática, utilizando las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación.

- ❖ Construir mediante seguimiento espectrofotométrico, la curva cinética de reacción de la enzima polifenoloxidasas de aguacate Hass "*Persea americana*", variedad "*Mill*". Con y sin adición de inhibidor.
- ❖ Determinar los parámetros cinéticos V_o , V_{max} , K_m , K_i , para el sistema, mediante gráficas de Lineweaver-Burk, así como determinar el tipo de inhibición.

CAPITULO 2

REVISION DE LITERATURA

2.1. TIPOS DE OSCURECIMIENTO EN ALIMENTOS

El oscurecimiento de acuerdo a sus mecanismos bioquímicos se clasifica (Según Dominic, 1989), como:

- Pardeamiento no enzimático
- Pardeamiento enzimático

2.1.1. Pardeamiento no Enzimático de Alimentos

El pardeamiento no enzimático, conocido como reacción de Maillard, caramelización o formación de melanoidinas, es un conjunto de reacciones muy complejas, que en diversos alimentos conducen a la formación de pigmentos pardos o negros, así como a modificaciones “favorables o no” del olor y sabor.

Los sustratos de estas reacciones son compuestos carbonilo y en primer lugar azúcares reductores.

El pardeamiento no enzimático se origina durante la preparación o almacenamiento de alimentos líquidos concentrados, tales como: leche, jugos de fruta, jarabes tomándose en cuenta como un efecto desfavorable (Matheis, 1987).

Por otro lado un efecto favorable del pardeamiento no enzimático, son: el color y aroma que caracterizan a numerosos alimentos como: corteza de pan, papas fritas, carnes asadas y caramelos, entre otros.

El pardeamiento no enzimático se acelera por el calor y por lo tanto, durante las operaciones de cocción, pasteurización y deshidratación (Jean, 1976).

2.1.2. Pardeamiento Enzimático de Alimentos

El color café que se forma cuando se exponen al aire las superficies cortadas o maltratadas de frutas, verduras y mariscos, se conoce como pardeamiento enzimático porque las reacciones iniciales que intervienen en este fenómeno están catalizadas por enzimas. La enzima que inicia el pardeamiento tiene varios nombres comunes, entre otros: fenolasa, fenoloxidasa, tirosinasa, polifenoloxidasa y catecolasa. En los tejidos vegetales intactos, la polifenoloxidasa y sus sustratos fenólicos están separados por estructuras celulares y el pardeamiento no se produce. Al hacerse un corte o magulladura, o dañarse de cualquier otra forma la integridad de los tejidos vegetales, con frecuencia la enzima y sus sustratos se ponen en contacto.

2.1.2.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de las diferentes reacciones bioquímicas que constituyen el metabolismo de los seres

vivos. Para que se produzca una determinada reacción, es necesaria la presencia de una enzima determinada.

Las enzimas favorecen reacciones químicas específicas, y son muchos los alimentos que contienen un gran número de enzimas activas. Las enzimas son grandes moléculas de proteína que, al igual que otros catalizadores, para ser efectivas, sólo necesitan estar presentes en pequeñas cantidades.

Las enzimas actúan disminuyendo las energías de activación de sustratos específicos. Realizan esta acción combinándose con el sustrato para formar un complejo enzima-sustrato (ES) que es menos estable que el sustrato sólo. Así se supera la resistencia a la reacción. El sustrato excitado pasa o cae en un nivel de energía todavía menor formando nuevos productos de la reacción. En el curso de reacción, la enzima se libera inalterada. El hecho de que la enzima se libere y pueda continuar actuando explica por qué las enzimas son efectivas en cantidades traza.

2.1.2.2. Nomenclatura

Muchas enzimas han sido designadas añadiendo el sufijo “asa” al nombre del sustrato, es decir, de la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica. Esta nomenclatura ha ocasionado que muchas enzimas hayan recibido nombres que químicamente son poco informativos.

Debido a que el número de enzimas aumenta rápidamente, se ha adoptado una clasificación sistemática de las enzimas recomendada por la comisión internacional de enzimas.

Cada enzima se designa con un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual; por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de una enzima.

2.1.2.3. Clasificación de las Enzimas

La clasificación propuesta por la Comisión Internacional de Enzimas, parece ser una de las más generalizadas y de acuerdo a ella, las enzimas se dividen en seis clases principales: oxidoreductasas, que catalizan reacciones de oxidación o reducción; transferasas, que catalizan la transferencia de variedades químicas específicas; hidrolasas, que hidrolizan los sustratos con una absorción concomitante de moléculas de agua; las liasas, que eliminan o adicionan variedades químicas específicas a sus sustratos; las isomerasas, que catalizan la isomerización y las ligasas que catalizan la síntesis o enlace de unidades de sustrato.

Sin embargo, la mayoría de las enzimas presentes en los alimentos o utilizadas para propósitos tecnológicos pertenecen a las clases de las oxidoreductasas, como es la peroxidasa o catalasa y las hidrolasas como la amilasa, proteasa o fosfatasa.

2.1.3. Polifenoloxidasas

La polifenoloxidasas (EC 1. 10. 1. 1), es una enzima perteneciente al grupo de las oxidoreductasas. Tiene mucha importancia en la gran mayoría de los vegetales ya que esta directamente relacionada con el oscurecimiento enzimático que tiene lugar durante el almacenamiento o durante algunas labores de procesamiento.

Polifenoloxidasas, es un término genérico utilizado para un grupo de enzimas responsables de causar pardeamiento en frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Mayer y Harel, 1979; Wiley, 1997). Para que la enzima actúe, es necesaria la presencia de cobre en el centro activo de la enzima, estado en el que la enzima puede ligar oxígeno (Whitaker, 1972; Masón, 1955; Prota, 1988; Golan – Goldhirsh et al., 1984; McEvily et al., 1992).

La polifenoloxidasas presente en tejidos de plantas, es importante durante el procesamiento de las frutas y hortalizas y almacenamiento de alimentos ya que se encuentra relacionada con el oscurecimiento enzimático.

2.1.3.1 Características de la Enzima Polifenoloxidasas

La polifenoloxidasas, puede oxidar una gran variedad de sustratos fenólicos para producir quinonas.

Los sustratos comunes de la polifenoloxidasas en los tejidos vegetales incluyen el aminoácido tirosina y los compuestos polifenólicos como catequina,

ácido caféico y ácido clorogénico. La tirosina, por ser un monofenol, se hidroxila primero a 3,4- dihidroxifenilalanina y después se oxida a una quinona (Miller, 2001).

La polifenoloxidasas tiene una especificidad de sustrato poco estricta, sin embargo, las enzimas procedentes de distintas fuentes difieren en su actividad relativa frente al sustrato específico. Entre los sustratos monofenol y difenol, aplicados para monitoreo de la actividad se encuentran: el catecol, el 4- metil catecol, la dopamina (3,4 dihidroxifeniletilamina), el pirogalol, la catequina, el ácido cafeico, el ácido clorogénico, el *p*-cresol, la tirosina y el ácido *p*-hidroxicinámico.

La polifenoloxidasas tiene un peso molecular de 34,000 D (Kertesz & Zito, 1957) y contiene un 0.20% de Cu. La enzima contiene un ion de Cu por molécula.

2.1.3.2 Mecanismo de Reacción de la Polifenoloxidasas

La actividad de la polifenoloxidasas en la mayoría de las frutas y hortalizas, durante su procesamiento o en la fase bioquímica de maduración post-cosecha origina algunos cambios indeseables de color, sabor, olor y hasta la reducción de ciertas propiedades nutricionales (Mayer, 1982; Sánchez, et al., 1989; Raymond et al., 1990; Junquera et al., 1992; Tan y Harris, 1995; Kader et al., 1990); y el principal problema que origina es el oscurecimiento enzimático en los procesos y consumo en fresco.

La actividad de la polifenoloxidasas consiste básicamente en catalizar dos reacciones en cadena en presencia de oxígeno: primero, tiene lugar la hidroxilación de monofenoles a difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y posteriormente, los difenoles formados se transforman en quinonas (actividad o-difenolasa o catecolasa) (Nicolas, et al., 1994).

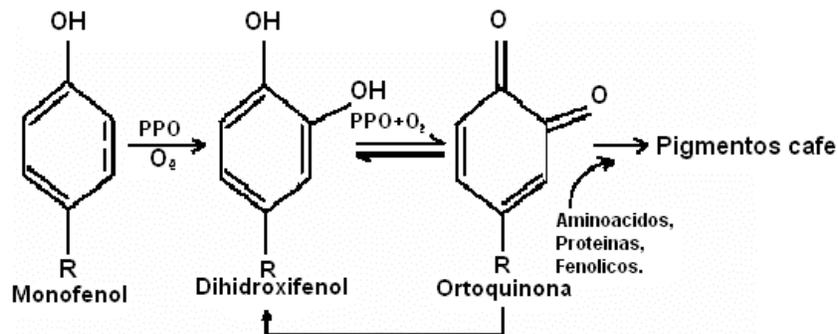


Figura 1: Acción de la Polifenoloxidasas sobre los compuestos fenólicos.

Las o-quinonas son precursoras de compuestos de color café. Ellas mismas poseen poco color, sin embargo, dan lugar a hidroxiquinonas que se polimerizan y oxidan fácilmente dando, así, el color café de las frutas. Esta última reacción de oxidación es rápida y no es enzimática (Dorminic, 1989).

2.1.3.3. Importancia de la Polifenoloxidasas

Además de la gran importancia en la determinación de los atributos de calidad de frutas y hortalizas, y que a través de sus reacciones se pueden producir cambios de color, sabor y valor nutritivo en productos vegetales frescos, enlatados y congelados (Mathew y Parpia, 1971), la polifenoloxidasas juega un papel muy importante en metabolismos vegetales, por su participación en otros

procesos tales como la síntesis de lignina, la oxidación del ácido indol acético (AIA) y aspectos fitopatológicos relacionados con resistencia a enfermedades (Guadarrama, 1995).

2.1.3.4 Investigaciones Acerca del Estudio de la Polifenoloxidasas

Debido a la especificidad de la polifenoloxidasas para el sustrato fenólico y el oxígeno, se han establecido métodos de monitoreo de actividad enzimática. Estos han sido desarrollados en función a esta propiedad, dichos métodos incluyen a los métodos: oximétricos (Mayer y Harel, 1979) y a los métodos espectrofotométricos, los cuales pueden medir la aparición de las o-quinonas (Waite, 1976; Cabanes et al., 1987).

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

Se han realizado una gran cantidad de trabajos sobre la polifenoloxidasas principalmente en frutos, en comparación a trabajos realizados en hortalizas y en órganos subterráneos reservantes. Ha sido estudiada en frutos tales como aguacate (Khan, 1985; Laderoza et al., 1980), cambur (Palmer, 1963; Rivas, 1978), durazno (Paulson y Vanderstoep, 1980; Wong et al., 1972), pera (Rives y Whitaker, 1973; Wisseman y Montgomery, 1985), mango (Thomas y Janave, 1973). También en espinaca (Sato, 1982). Teniendo todos ellos una importante

aportación para el conocimiento más profundo de la forma de acción de la enzima polifenoloxidasas así como de la forma de inhibir su reacción.

2.1.4. Acción de los Polifenoles en los Vegetales

La gran diversidad estructural y funcional característica de los compuestos fenólicos o polifenoles ha dificultado la tarea de definir este extenso conjunto de sustancias naturales a las que se agrupó por el hecho de poseer un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, como queda reflejado en su nomenclatura. Esta definición basada en la estructura bioquímica no se ajusta a la totalidad de compuestos que tradicionalmente se consideran polifenoles.

Los polifenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, en general y debido a que en su forma polimérica se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes.

Con anterioridad se señala que la enzima polifenoloxidasas afecta a las plantas que contienen compuestos fenólicos. La enzima polifenoloxidasas está presente en todas las plantas pero se encuentra particularmente en altas concentraciones en champiñones, tubérculos de papa, duraznos, manzana, hoja de té, café, hojas de tabaco, y **aguacate**.

2.2 EL AGUACATE.

El aguacate es una dicotiledónea perteneciente al orden de las Ranales y la familia de las lauráceas. Es un fruto cuyo valor nutritivo y

energético, que proporciona al organismo de 150 a 300 calorías por cada 100 g comestibles. Por esto, representa una importante y sana fuente de alimentación humana, siendo la única fruta conocida que posee todos los elementos nutritivos: glúcidos (hidratos de carbono), próticos (sustancias proteínicas), lípidos, vitaminas, sales minerales y agua. El fruto de aguacate, cuenta con una corteza gruesa, dura y rugosa, una pulpa de consistencia mantecosa y tonos verde amarillentos de sabor agradable. En el interior se aloja la única semilla no comestible, de forma redondeada y de color pardo cuyo tamaño oscila entre los 2 y los 4 cm de longitud. El peso normal de cada pieza de aguacate oscila entre los 200 y 400g, aunque los hay de mayor peso (Morales, 2000).

2.2.1. Importancia Económica

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

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

2.2.1.1. Importancia Mundial

La explotación intensiva del aguacate comienza hace aproximadamente 50 años en California y Florida y se extiende a Israel, Sudáfrica, Argelia, etc.

La importancia socioeconómica del aguacate se deriva del beneficio que derrama entre productores y comercializadores. Los huertos generan empleo al demandar mano de obra para podas, riegos, cuidado nutritivo y fitosanitario, cosecha, acarreo y ventas al mayoreo y menudeo.

2.2.1.2. Importancia del Aguacate en México

Debido a que se le considera un producto muy perecedero su consumo se prefiere que sea en fresco además de que consumiéndolo en este estado se hacen aprovechables las cualidades nutritivas y energéticas que este posee.

Su consumo a nivel nacional va en aumento porque previene enfermedades del corazón y del sistema circulatorio, ya que disminuye exceso de grasas en la sangre, según expertos en nutrición y dietética del IMSS (Asociación americana de diabetes, 2002).

2.2.2. Conservación del Aguacate

La temperatura a la que deben de ser transportados y conservados los aguacates, no debe sobrepasar los 10°C y tampoco debe ser menor a 4.5°C, con una humedad relativa del 85% y con un 3% de anhídrido carbónico, superior al normal de la atmósfera. Si las temperaturas son inferiores a 4.5°C, el producto

sufre alteraciones, es decir, su color cambia a pardo ó negro y el sabor y el olor de la pulpa se tornan desagradables.

El uso de temperaturas adecuadas de conservación contribuye a alargar la vida de los productos y disminuye la velocidad de maduración de los mismos. Aunque estos métodos no deben de excederse de los 30 a 40 días, ya que la acción de la enzima polifenoloxidasa aumenta a medida de que el almacenamiento se prolonga por varios días, ocasionando que la fruta sea susceptible a cambios indeseables (Paz, 1987).

En ocasiones el manejo del aguacate se hace un tanto difícil, debido a que exige un mejor manejo post – cosecha por parte de los que intervienen en el proceso de producción, comercialización, industrialización y consumo; de ahí el porque la preferencia de que sea consumido fresco.

El aguacate es un fruto de gran aceptación en el mercado nacional, sin embargo la mayoría de las veces su consumo se restringe porque su periodo de almacenamiento es corto si no se le da el manejo adecuado, dando lugar a reacciones bioquímicas de oscurecimiento enzimático.

2.2.3. Oscurecimiento del Aguacate

El pardeamiento enzimático de los alimentos normalmente se considera un cambio adverso, porque reduce el grado de aceptación del alimento.

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

El oscurecimiento o pardeamiento enzimático constituye uno de los principales problemas en el procesamiento de las frutas y verduras y es causado por la producción de polifenoles (Corsé, 1964; Whitaker, 1972). La reacción de oscurecimiento usualmente se inicia en los tejidos dañados, donde la pérdida de la compartimentación celular permite que la polifenoloxidasa y los sustratos fenólicos se mezclen (Vigyazo, 1981).

El oscurecimiento es medido por la acción de una enzima (o múltiples enzimas) que oxidan al catecol a orto – quinonas.

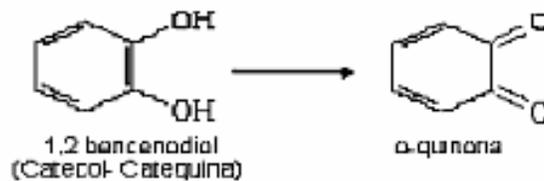


Figura 2: Oxidación del catecol.

La aparición del color café sobre las frutas y verduras se debe a reacciones de las o-quinonas, que comprenden la oxidación catalizada en forma no enzimática y la polimerización de los productos de oxidación.

Estas polimerizaciones originan compuestos coloreados oscuros conocidos como melanodionas.

Paralelamente con la alteración del color, se producen cambios en el sabor y pérdidas apreciables del valor nutrimental de estos alimentos. Debido a ello, este es uno de los principales problemas de conservación de los productos agrícolas después de cosecha o durante el procesamiento industrial (Vámos-Vigyázó, 1981; McEvily et al., 1992), y el principal problema que se origina en los procesos de obtención de pulpas y elaboración de bebidas.

Para, los fines del 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, la temperatura, los sustratos, los inhibidores, etc.

El aguacate (Hass *Persea americana* variedad *mill*), es altamente susceptible al oscurecimiento enzimático, se encontró una fuerte relación directa entre el daño de la fruta de aguacate y la actividad de la enzima presente (Kahn, 1975).

2.2.4. Productos Secundarios de Formación

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

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

La peroxidasa también tiene importancia en el oscurecimiento enzimático de frutas y hortalizas. Esta enzima tiene un peso molecular de cerca de 40,000 Da y contiene un átomo de Fe por cada molécula de grupo hemo que es un grupo prostético (Whitaker, 1972).

La inactivación de la polifenoloxidasas es muy difícil debido a su elevada actividad y resistencia a los tratamientos.

2.2.5 Control del Pardeamiento Enzimático.

Para el control del pardeamiento enzimático de los alimentos se utilizan varios métodos basados en una o más consideraciones dadas en el mecanismo de acción. A continuación se da un resumen de estos métodos:

- ❖ Inactivación de la polifenoloxidasas con calor: este procedimiento se utiliza con frecuencia en verduras que se cuecen antes de su consumo. No es adecuado para frutas.
- ❖ Inhibición química de la polifenoloxidasas: los sulfitos son buenos inhibidores, pero su uso se restringe por la FDA, porque provocan reacciones alérgicas; los acidulantes como el ácido cítrico inhiben a la polifenoloxidasas porque reducen el pH por debajo del valor óptimo; los

agentes quelantes o secuestrantes, como el EDTA y el ácido cítrico, inhiben a la enzima al unirse al cobre, un cofactor esencial.

- ❖ Agentes reductores: los agentes que reducen las o-quinonas a compuestos fenólicos inhiben el pardeamiento enzimático. Los ácidos ascórbico y eritórbito se usan para evitar pardeamiento en frutas recién cortadas.
- ❖ Exclusión de oxígeno: esto se logra con empaques al alto vacío.
- ❖ Enzimas proteolíticas: atacan a la polifenoloxidasas, aunque no son muy usadas.
- ❖ Tratamiento con miel: la miel contiene inhibidores de la polifenoloxidasas, es eficaz en frutas cortadas. Su uso no es muy amplio.

Algunos de estos tratamientos presentan efectos adversos sobre las características organolépticas y nutritivas de las frutas, por lo que son necesarias nuevas formas de conservación que minimicen el impacto de estas operaciones de procesado, otros en cambio son de uso restringido por causar reacciones alérgicas como es el caso de los sulfitos.

Varias propuestas para obtener productos de aguacate han fallado debido al proceso de oscurecimiento (Gerdes y Parrino-Lowe, 1995), debido a que ninguna de estas propuestas contemplaba la caracterización de la enzima polifenoloxidasas, ni las formas de inhibir los efectos causados por esta enzima.

2.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas específicas se llama actividad enzimática. Las actividades enzimáticas pueden determinarse midiendo la velocidad de desaparición de los sustratos o la velocidad de aparición de los productos.

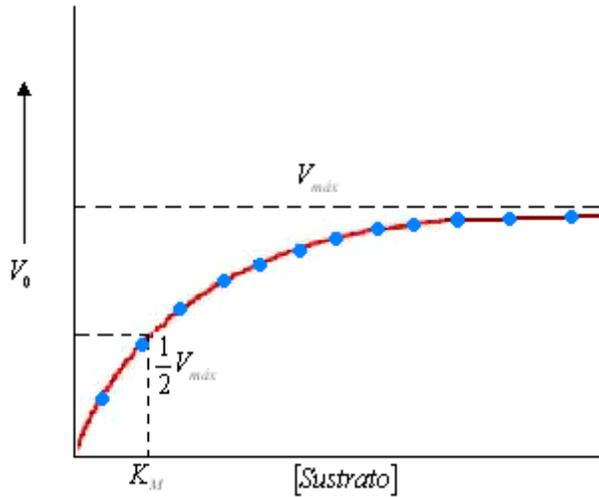
La polifenoloxidasasa puede analizarse si se mide la absorción de oxígeno, la desaparición de compuestos fenólicos, la formación del color café o la formación de un intermediario en la reacción, como sería una quinona específica.

La actividad enzimática se determina por análisis con enzimas; en los que la enzima y su sustrato se mezclan y el progreso de la reacción se registra a lo largo del tiempo.

La velocidad es proporcional a la concentración de enzima, es decir, cuanto mayor es la concentración de enzima, mayor será la reacción.

En un análisis con enzimas es importante medir la rapidez inicial, porque esta se reducirá a medida que la reacción avance. Asimismo, en algunas reacciones, la inhibición por formación del producto hará más lenta la reacción.

La velocidad de muchas reacciones catalizadas por enzimas, presenta una relación hiperbólica con la concentración del sustrato. Las enzimas que presentan esta relación obedecen la cinética de Michaelis – Menten.



Grafica 1: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.

2.3.1. Transformaciones de la Ecuación de Michaelis – Menten

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales. Una de las transformaciones se obtiene tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{m\acute{a}x} [S]}$$

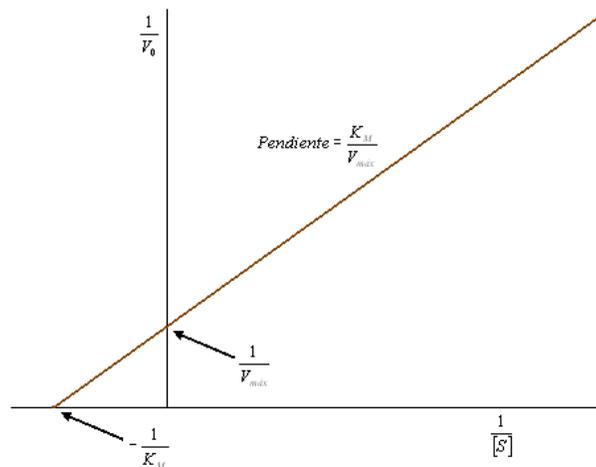
Reordenando, tendremos:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x} [S]}$$

que se reduce a:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Esta última ecuación; es la ecuación de Lineweaver-Burk. Cuando $1/V_0$ se representa frente a $1/[S]$, se obtiene una línea recta. La pendiente de la recta es $K_M/V_{m\acute{a}x}$, y la intersección sobre el eje $1/[S]$ es $-1/K_M$. Esta representación tiene como ventaja una determinación más exacta del valor de $V_{m\acute{a}x}$, ya que en la representación sencilla de V_0 frente a $[S]$ sólo se obtiene un valor aproximado (ver grafica 1). Esta representación también proporciona información muy valiosa acerca de la inhibición enzimática.

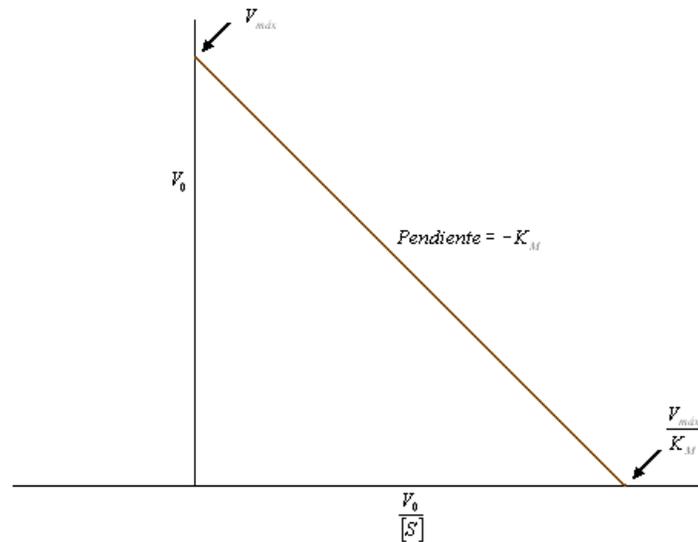


Gráfica 2: Representación (Lineweaver – Burk), doble recíproca.

Otra transformación de la ecuación de Michaelis-Menten se obtiene multiplicando ambos miembros de la ecuación de Lineweaver-Burk por $V_{m\acute{a}x}$, y reordenando para dar la ecuación denominada: representación de Eadie-Hofstee.

$$V_0 = -K_M \frac{V_0}{[S]} + V_{m\acute{a}x}$$

Esta ecuación proporciona los valores de $V_{\text{máx}}$ y de K_M en forma muy sencilla, y además amplía las desviaciones del carácter lineal que pueden no aparecer en una representación doble recíproca.



Gráfica 3: Representación de Eadie – Hofstee

2.3.2. Inhibición Enzimática

Cualquier sustancia que limita la actividad de una enzima es un inhibidor. En vista de la naturaleza proteínica de las enzimas, cualquier sustancia que desnaturalice a las proteínas se transforma automáticamente en un inhibidor. Un impedimento o una transformación de grupos estratégicos sobre las enzimas, grupos prostéticos, coenzimas o iones activadores inhibirán la actividad enzimática.

Aun cuando las enzimas suelen ser muy específicas respecto a unión con otros sustratos, en ciertos casos la enzima se une con otro sustrato cuya

estructura, tamaño y relaciones de grupos funcionales son idénticas a las del sustrato original. Cuando la enzima “engañada” se combina con un sustrato de este tipo, el fenómeno inicial se retrasa o cesa completamente porque la enzima no puede actuar sobre el falso sustrato como sobre el propio.

2.3.3. Tipos de Inhibición

Existen tres tipos principales de inhibición reversible de las enzimas: competitiva, incompetitiva y no competitiva, pueden distinguirse de forma experimental por los efectos que produce el inhibidor sobre la cinética de reacción de la enzima, la cual puede analizarse mediante la ecuación básica de velocidad propuesta por Michaelis-Menten.

2.3.3.1. Inhibición Competitiva

La característica de la inhibición competitiva es que el inhibidor puede combinarse con la enzima libre de tal modo que compite con el sustrato normal para unirse al centro activo. La inhibición competitiva se reconoce experimentalmente con facilidad, debido a que el porcentaje de inhibición para una concentración de inhibidor constante disminuye al incrementarse la concentración del sustrato.

Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo *enzima-inhibidor* (EI) análogo al complejo enzima-sustrato:



La molécula del inhibidor no resulta químicamente alterada por la enzima. Siguiendo el formalismo de Michaelis-Menten, se puede definir la constante del inhibidor K_i , como la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor:

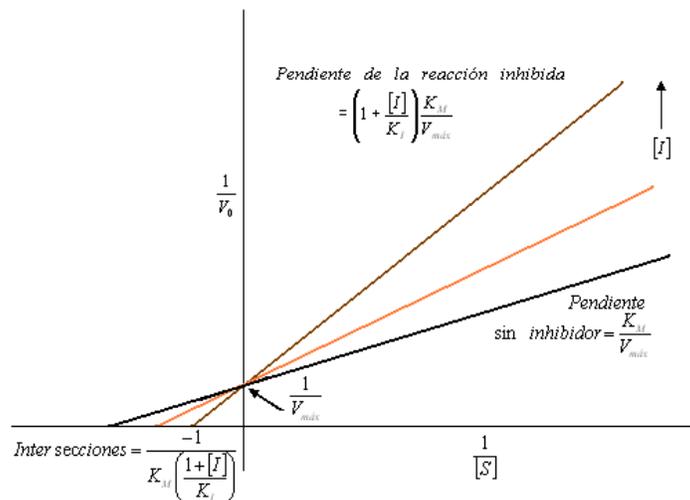
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

La constante del inhibidor, K_i , es comparable por tanto a K_S , constante de disociación del complejo enzima-sustrato. En el análisis cinético cuantitativo, el efecto de la variación de la concentración del sustrato $[S]$ sobre la velocidad inicial V_0 , viene determinada para una concentración constante del inhibidor.

A continuación se trazan representaciones de $1/V_0$ frente a $1/[S]$, para cada una de las concentraciones del inhibidor. Estas representaciones se caracterizan por proporcionar una familia de líneas rectas cuyo punto de intersección común se halla sobre el eje de $1/V_0$ (ver gráfica 4). La presencia de un inhibidor competitivo incrementa, por tanto, la K_M aparente del enzima por el sustrato; es decir, provoca que se precisen concentraciones de sustrato superiores para que se alcance la velocidad máxima. El valor de la K_M aparente del sustrato será mayor que la verdadera K_M al aumentar el valor de la intersección sobre el eje $1/[S]$. Como la pendiente de la representación de la reacción no inhibida es $K_M/V_{m\acute{a}x}$ y la pendiente de la recta para la reacción inhibida es $K_M/V_{m\acute{a}x} (1+[I]/K_i)$, se observa que experimenta un incremento, que se

expresa con el factor $1 + [I]/K_i$. A partir de esta relación se puede calcular el valor de K_i .

Un inhibidor competitivo se caracteriza por no afectar el valor de $V_{\text{máx}}$, indicando con ello que no interfiere con la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato.



Gráfica 4: Representación doble recíproca que muestra el efecto de la inhibición competitiva.

2.3.3.2. Inhibición Acompetitiva

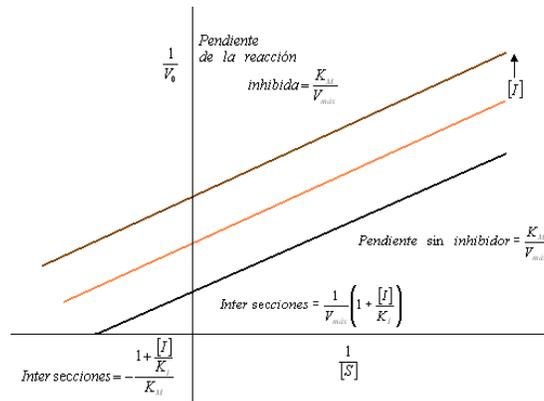
En este tipo de inhibición, el inhibidor no se combina con la enzima ni afecta a su reacción con el sustrato normal; sin embargo, el inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar un complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor, el cual no experimenta su transformación posterior en el producto habitual de la reacción.



La constante del inhibidor es, por tanto:

$$K_I = \frac{[ES][I]}{ESI}$$

La inhibición acompetitiva se reconoce con gran facilidad en las representaciones de $1/V_0$ frente a $1/[S]$ para concentraciones constantes de inhibidor. Lo característico de la inhibición acompetitiva es que la pendiente de las rectas permanece constante al aumentar la concentración del inhibidor, pero la $V_{m\acute{a}x}$ decrece. La inhibición acompetitiva es poco frecuente en las reacciones de un solo sustrato, pero es muy común en las reacciones de dos sustratos.



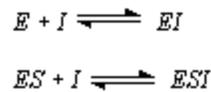
Gráfica 5: Representación doble recíproca que muestra el efecto de la inhibición acompetitiva.

2.3.3.3. Inhibición No Competitiva

Un inhibidor no competitivo puede combinarse con la enzima libre o bien con el complejo enzima-sustrato, interfiriendo con la acción de ambos. Los inhibidores no competitivos se unen a un centro de la enzima distinto del centro activo, a menudo para deformar a la enzima, de modo que no pueda formarse el

complejo ES a su velocidad normal y que una vez formado no se descomponga a su velocidad habitual para liberar los productos de reacción. Sus efectos no se anulan al aumentar la concentración de sustrato.

En la inhibición no competitiva la reacción con el inhibidor produce dos formas inactivas, EI y ESI:

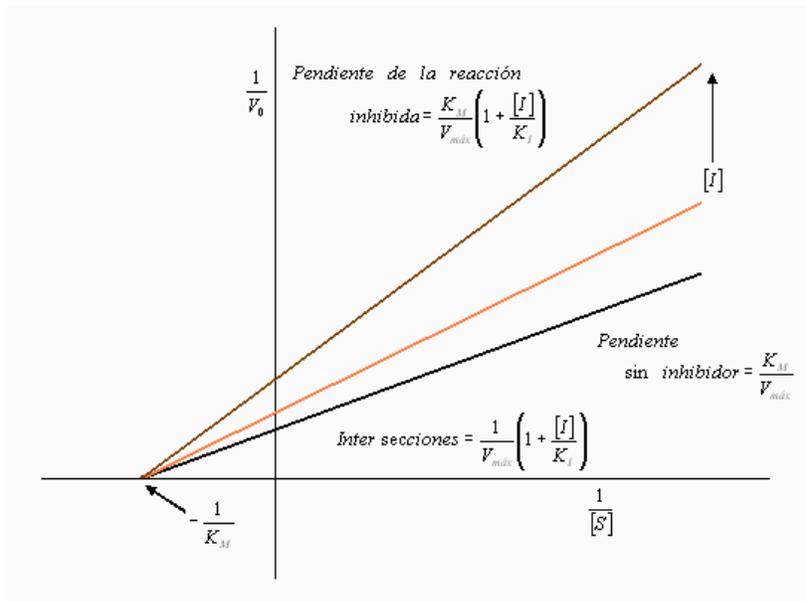


Para las que existen dos constantes del inhibidor:

$$K_I^{EI} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$
$$K_I^{ESI} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

que pueden ser iguales o diferentes. La inhibición no competitiva se reconoce con facilidad en las representaciones de $1/V_0$ frente a $1/[S]$, en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor, que se mantienen constantes (ver gráfica 6).

Las representaciones difieren en pendiente pero no comparten un punto de intersección común sobre el eje $1/V_0$. El valor de la intersección sobre dicho eje es mayor para la enzima inhibida que para la enzima no inhibida, lo que indica que la $V_{m\acute{a}x}$ decrece en presencia del inhibidor y no puede restablecerse su valor a pesar de que la concentración del sustrato pueda ser elevada.



Gráfica 6: Representación doble recíproca que muestra el efecto de la inhibición no competitiva.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

3.1 ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo abarco la extracción, purificación de la enzima polifenoloxidasa, obtenida de la pulpa de aguacate y caracterización de los parámetros cinéticos, así como también del mecanismo de acción de la capacidad inhibitoria del proceso de oscurecimiento enzimático mediante compuestos extraídos de la semilla del propio fruto.

Para el desarrollo de este trabajo se hizo una planeación por etapas en las cuales se incluyeron los siguientes puntos:

- ❖ Extracción de la enzima polifenoloxidasa a partir de pulpa de aguacate Hass *Persea americana*, variedad *Mill*.
- ❖ Establecimiento de técnicas adecuadas de purificación de enzimas (diálisis, cromatografía en columna con silicagel y resina de intercambio cationico).
- ❖ Determinación de la actividad de la enzima polifenoloxidasa, espectrofotométricamente, variando la concentración de enzima y de sustrato inicial.
- ❖ Extracción de compuestos con capacidad inhibitoria del proceso de oscurecimiento enzimático a partir de semilla de aguacate y la evaluación de su acción inhibitoria.

- ❖ Determinación de constantes cinéticas V_0 , $V_{m\acute{a}x}$, K_M , K_I , así como el tipo de inhibición.

3.2 LOCALIZACIÓN

Este trabajo de investigación se llevo a cabo dentro de las instalaciones de 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), en distintos laboratorios entre los que destacan: laboratorio de nutrición y alimentos, laboratorio de ciencias básicas, laboratorio de producción animal y laboratorio de horticultura.

3.3 MATERIAL Y EQUIPO

3.3.1 Materiales empleados en el trabajo

Todos los materiales empleados en este trabajo de investigación se muestran en el siguiente listado:

- | | |
|------------------------|-------------------------------|
| ❖ Tabla | ❖ Tubos de ensaye |
| ❖ Espátula | ❖ Pissetas |
| ❖ Embudos | ❖ Matraces de aforación |
| ❖ Papel filtro N°5 y 1 | ❖ Matraces Erlen Meyer |
| ❖ Probetas | ❖ Tubos para centrifuga |
| ❖ Vasos de precipitado | ❖ Columnas para cromatografía |
| ❖ Gradillas | ❖ Micropipetas |

3.3.2. Equipos de laboratorio

Los equipos que se utilizaron en esta investigación se muestra en el siguiente listado:

- ❖ Refrigerador, marca Hotpoint
- ❖ Congelador, American
- ❖ Balanza, Sauter
- ❖ Licuadora, Phillips
- ❖ Centrifuga, IEC
- ❖ Bomba de vacío, Duo seal™ Vacuum pump
- ❖ Potenciómetro, Corning
- ❖ Agitador magnético, Termolyne
- ❖ Vortex, Genie mixer
- ❖ Espectrofotómetro, Genesy™
- ❖ Balanza analítica A&D

3.3.3. Reactivos

Buffer fosfatos 0.1 M, pH 6.8, NaOH 0.313 N, HCl 0.1 N; 1N, acetona, colorante azul brillante de coomasie, agua destilada, catecol, albúmina, etanol, metanol, NH₄OH 1 y 3N, silicagel, dowex-50.

3.4 MATERIAL VEGETAL

Los aguacates fueron adquiridos en el mercado local de la ciudad de Saltillo, Coahuila. De la variedad elegida se compraron 4 kg con una madurez aproximada de $\frac{3}{4}$, esto represento la cantidad necesaria para la realización de este trabajo de investigación. Posteriormente este material vegetal fue llevado al laboratorio de nutrición y alimentos de la división de ciencia animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para su estudio. Estos aguacates fueron congelados a una temperatura de -15° C por 24 horas.

3.5 EXTRACCIONES

3.5.1 Extracción de Enzima Polifenoloxidasas

El material vegetal se saca del congelador para ser descongelado a temperatura ambiente, esto con la finalidad de provocar la liberación de la enzima contenida en la pulpa por medio de deshidrocongelación. Posteriormente se separa la pulpa del hueso y se homogeniza en una licuadora utilizando buffer fosfatos 0.1 M pH 6.8 (por cada 50 g de pulpa se adicionan 100 ml de buffer fosfatos) la mezcla se centrifuga a 3000 rpm durante 45 min (se recomienda que la temperatura de la centrifuga sea lo más fría posible). Las velocidades de centrifugación recomendadas son a velocidades de 36.717 G por 30 min (Guadarrama y nilo rivas, 1990) así como de temperaturas óptimas de trabajo de -15° C.

Después de la centrifugación la porción líquida se filtra con filtro del número 5, y el precipitado se descarta (la porción líquida es la que representa al extracto crudo que contiene la enzima); al extracto crudo se le agrega un doble volumen de acetona fría (-15° C), esta mezcla se somete a una segunda centrifugación durante 30 minutos a 3000 rpm, después de la centrifugación el sobrenadante se descarta, y el precipitado que representa a la enzima se resuspende en 30 ml de buffer fosfatos 0.1 M pH 6.8, para el manejo de la enzima en todo el procedimiento se recomiendan temperaturas óptimas de trabajo de -15°C (Guadarrama y Nilo, 1990). Las características del equipo con el que se estuvo trabajando no hicieron posible trabajar bajo las recomendaciones (T° y rpm en centrifugación), antes mencionadas.

3.5.2 Extracción de Compuestos con Capacidad Inhibitoria a Partir de Semilla de Aguacate

Se utiliza el mismo procedimiento en la extracción de enzima polifenoloxidasa contenida en la pulpa, sólo que para esta extracción la pulpa se sustituye por la semilla de aguacate.

3.6 PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

3.6.1 Purificación por Diálisis

La muestra conteniendo el extracto enzimático (proteína), se introdujo en una bolsa o tubo de membrana semipermeable y se cerraron los extremos como se muestra en la figura 3, con el fin de separar las moléculas pequeñas de

las grandes en solución basándose en sus diferentes velocidades de difusión a través de una membrana. La bolsa que contiene la solución se sumerge en agua destilada y se mantiene en agitación constante durante 24 horas, durante este tiempo la membrana permite que las moléculas pequeñas se difundan al agua del exterior, dejando en el interior de la bolsa las moléculas más grandes (Bender, Arnold E., 1990).

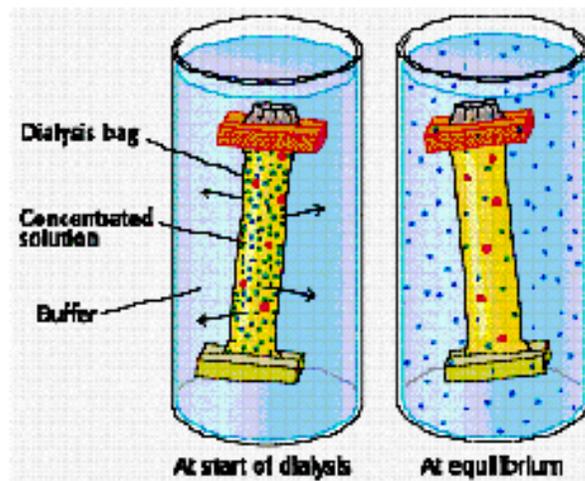


Figura 3: Purificación por diálisis

Es un método corriente para separar proteínas de las sales disueltas. El agua pasa a través de la membrana diluyendo la solución salina hasta que la presión hidrostática de la solución contrarresta la fuerza de atracción de la solución por el agua, es decir su presión osmótica.

3.6.2 Cromatografía en Columna

3.6.2.1 Preparación de la Columna con Resina para Cromatografía de Intercambio Iónico Dowex-50

Se disolvió resina Dowex-50 –X2 en agua destilada, para después introducirla a la columna a un nivel de 7 cm, se pasaron por la columna 150 ml de HCl 1 N, 150 ml de agua destilada (para neutralizar), se monitoreo hasta llegar a pH 7, posteriormente la columna se empezó a utilizar.

3.6.2.2 Obtención de Fracciones

A la columna preparada se le agregó el extracto enzimático y se lavó con agua destilada. Después se pasaron por la columna 250 ml de etanol al 50%, 150 ml de agua destilada, 75 ml de NH₄OH 1 N, 150 ml de NH₄OH 3 N, 50 ml de agua destilada. A la par en otra columna se agregaron 250 ml de acetona 50%, 150 ml de agua destilada, 75 ml de acetona 1 N, 150 ml acetona 3 N, 50 ml de agua destilada.

Se evaluaron las fracciones obtenidas de acuerdo con la actividad de la polifenoloxidasa en presencia de sustrato en la técnica cinética de reacción sin inhibidor a fin de evaluar las porciones obtenidas.

En la figura 4, se muestra el principio de la cromatografía de intercambio iónico. Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente y son retenidas; las partículas cargadas positivamente

son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidas. La elusión de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoeléctrico o hasta invertir su carga neta (Matheus, 2002; Berg 2002).

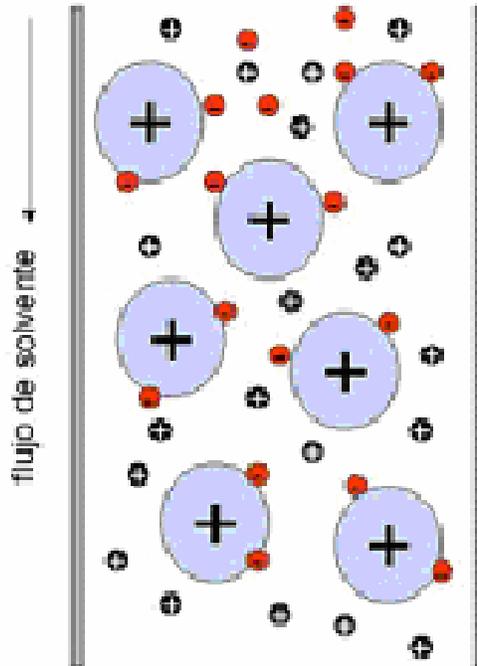


Figura 4: Cromatografía de intercambio iónico

3.6.2.3 Cromatografía en Columna con Silicagel

En la preparación de la columna se utilizó silicagel 60 en gránulos, para cromatografía en columna. El silicagel se introdujo a la columna en su forma seca al nivel deseado (7cm). En esta técnica se evaluaron diferentes solventes tales como: etanol, metanol, agua destilada, acetona. Y en una segunda se evaluaron los solventes: agua destilada, acetona, hidróxido de amonio 1N y 3N.

3.7. TÉCNICA CINÉTICA DE REACCIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA SIN INHIBIDOR

Para este ensayo se utilizó el método espectrofotométrico de Pontingy Joslyn (1948), utilizando catecol como sustrato.

La mezcla de reacción estaba formada por: buffer fosfatos 0.1M pH 6.8, extracto enzimático puro, y catecol como sustrato, variando la concentración de enzima constante y variando la concentración de sustrato.

En esta técnica se midieron y se evaluaron los cambios que se presentaban al mezclar el sustrato con la enzima a una absorbancia de 420nm en función del tiempo. Esta técnica se registro en un espectrofotómetro.

Los datos obtenidos se graficaron y la actividad enzimática se calculo a partir de las pendientes iniciales de las curvas cinéticas obtenidas, es decir midiendo la velocidad inicial en la formación de productos (quinonas), indicada por un incremento de absorbancia a 420nm.

3.8 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA

Esta determinación se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar para la elaboración de la curva patrón, utilizando reactivo azul brillante de coomasie. Para esta determinación se utilizó la mezcla de agua destilada, albúmina de suero de bovino variando la concentración y reactivo azul brillante de coomasie.

Tanto en la curva de calibración con albúmina y con la muestra problema se hizo la mezcla anterior, se homogenizó con la ayuda de un vortex, se dejó reposar por espacio de tres minutos (tiempo en el que el coomasie reacciona con la proteína), transcurrido el tiempo se hace la lectura en espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

3.9 CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

3.9.1 Estudio de la Variación de la Actividad Enzimática en Función de la Concentración de Sustrato

Para este ensayo se utilizó el método espectrofotométrico de Pontingy Joslyn (1948), utilizando catecol como sustrato.

La mezcla de reacción estaba formada por: buffer fosfatos 0.1 M pH 6.8, extracto enzimático puro, y catecol como sustrato.

3.9.2 Efecto de los Extractos con Capacidad Inhibitoria Obtenidos a Partir de la Semilla de Aguacate Hass *Persea americana*, Variedad *Mill*

Para este ensayo se utilizó el método espectrofotométrico de Pontingy Joslyn (1948), utilizando catecol como sustrato.

La mezcla de reacción estaba formada por: buffer fosfatos 0.1 M pH 6.8, extracto enzimático puro, extracto con capacidad inhibitoria obtenido de la semilla de aguacate y catecol como sustrato.

En esta técnica se midió y se evaluó la tasa inicial de formación de producto (quinonas), a partir de las pendientes iniciales de las curvas cinéticas graficadas, indicadas en el incremento de absorbancia a 420 nm, dividiendo la diferencia entre la actividad presentada en los sistemas libres del extracto inhibitorio y estos valores sobre la actividad obteniendo así los porcentajes de inhibición. Esta técnica se registro en un espectrofotómetro.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 ETAPA 1 Precipitación con Acetona

En el cuadro 1 se muestran los resultados de valores promedios obtenidos de la purificación primaria mediante precipitación con acetona (sistema 1).

Los datos obtenidos de la evaluación del extracto crudo fueron los siguientes:

- a) Actividad de 0.5438 DA/min & min/ml E.
- b) Actividad enzimática total de 10.876
- c) Contenido de proteína de 4.75 mg/ml
- d) Actividad específica de 0.1145 DA/min /mg P.
- e) Rendimiento del 100%

4.2 ETAPA 2 Purificación de la Enzima Polifenoloxidasas por Cromatografía en Columna con Resina Dowex-50 y Silicagel en Gránulos

Para llevar a cabo la purificación por cromatografía de intercambio iónico, se utilizaron dos soportes: Silicagel y Dowex-50 de los cuales el que mostró mejores resultados de estabilidad fue el soporte Dowex-50.

Para llevar a cabo la purificación de la enzima polifenoloxidasasa se utilizaron diferentes solventes, mismos que después fueron evaluados en función de la actividad. De los solventes utilizados en la cromatografía, la fracción con mayor actividad resulto ser la obtenida con NH_4OH 3N; siguiéndole la porción obtenida con NH_4OH 1N; las porciones obtenidas con acetona al 50% y H_2O no presentaron actividad.

En el cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos de valores promedios de los sistemas sobre la purificación de la polifenoloxidasasa, utilizando diferentes sustancias (H_2O , acetona, NH_4OH 1 N y NH_4OH 3 N) por cromatografía de intercambio iónico.

Para el sistema que contiene silicagel como soporte se presentó el siguiente comportamiento:

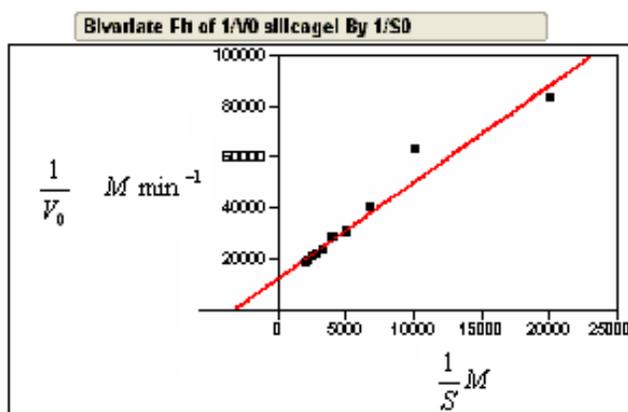
En las fracciones tratadas con agua y acetona 25₁-s y 25₂-s se puede apreciar que tanto el contenido de proteínas como la actividad enzimática son sumamente bajos, esto debido a que la fracción proteica es retenida en la columna de intercambio iónico.

Tratamiento	Volumen	Act	Act Enz total	Proteína mg/ml	Act esp	% Rendimiento	Purificación (veces)
		DA/min & min/ml E			DA/min & times mg P		
Crudo	20	0.5438	10.876	4.75	0.1145	100	1
25 ₁ -S	20	0.002	0.04	0.305	0.0066	6.42	0.057
50- S	20	0.03	0.6	1.173	0.0256	24.69	0.223
75- S	20	0.116	2.32	2.324	0.0499	48.93	0.436
25 ₂ -S	20	0	0	0	0	0	0
25 ₁ -D	20	0	0	0	0	0	0
50- D	20	0.032	0.64	1.102	0.0290	23.20	0.254
75- D	20	0.136	2.72	1.997	0.0681	42.04	0.595
25 ₂ -D	20	0.002	0.04	0	0	0	0

Cuadro 1: Purificación parcial de la enzima polifenoloxidasas con diferentes solventes.

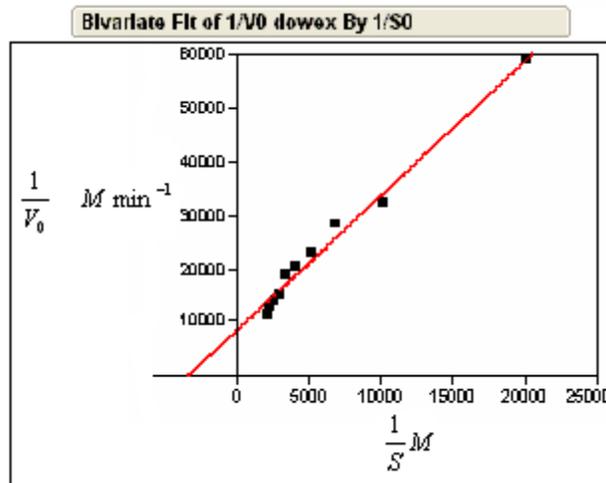
4.3 ETAPA 3 Determinación de Parámetros Cinéticos K_M y V_{max} . Para la Enzima Polifenoloxidasas.

En la gráfica 7: se muestra la representación gráfica en coordenadas inversas de Lineweaver-Burk del efecto de la concentración de sustrato catecol sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasas de aguacate Hass, *Persea americana*, variedad *Mill*. De esta fue posible obtener los valores de K_M el cual fue de 3.14 E-4 M y el de V_{max} fue de $8.20 \text{ E-5 M (min*ml)}^{-1}$. Para la fracción obtenida de la cromatografía con silicagel.



Gráfica 7: Efecto de la concentración de sustrato sobre la enzima polifenoloxidasas. Silicagel.

En la gráfica 8: se muestra la representación gráfica de Lineweaver-Burk del efecto de la concentración de sustrato catecol sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasasa de aguacate Hass, *Persea americana*, variedad *Mill*. El valor de K_M fue de 2.9 E-4 M y el valor de $V_{\text{máx}}$ fue de $1.11\text{E-4 M (min*ml)}^{-1}$. Para la fracción obtenida de la cromatografía con Dowex-50.



Gráfica 8: Efecto de la concentración de sustrato sobre la enzima polifenoloxidasasa. Dowex-50.

4.4 ETAPA 4 Extracción y aplicación de la fracción con capacidad inhibitoria a partir de semilla de aguacate

El extracto purificado parcialmente con acetona a -15°C , se sometió al método de purificación de cromatografía en columna con soportes de silicagel y resina Dowex-50, con diferentes solventes, mismos que después fueron evaluados. De las fracciones evaluadas la que arrojó mejores resultados de inhibición fue la fracción obtenida con acetona al 50% para los dos soportes.

4.4.1. Porcentaje de inhibición

La fracción obtenida por cromatografía de intercambio iónico con soporte silicagel presento los siguientes resultados: (ver cuadro 2).

[I]₀ en µl	% de inhibición
100µl	85.96%
200µl	89.47%
300µl	92.98%
400µl	94.74%

Cuadro 2: % de inhibición de la fracción obtenida con silicagel.

La fracción obtenida por cromatografía de intercambio iónico con soporte Dowex-50 presento los siguientes resultados: ver cuadro 3.

[I]₀ en µl	% de inhibición
100µl	41.94%
200µl	80.65%
300µl	91.94%
400µl	95.16%

Cuadro 3: % de inhibición de la fracción obtenida con resina Dowex-50.

De los cuadros 2 y 3 es posible apreciar que tanto para los extractos purificados con silicagel como con Dowex se aprecian porcentajes de inhibición

significativos, superiores al 80% al aplicar alrededor de 200 μl en el sistema llegando hasta el 95% de inhibición.

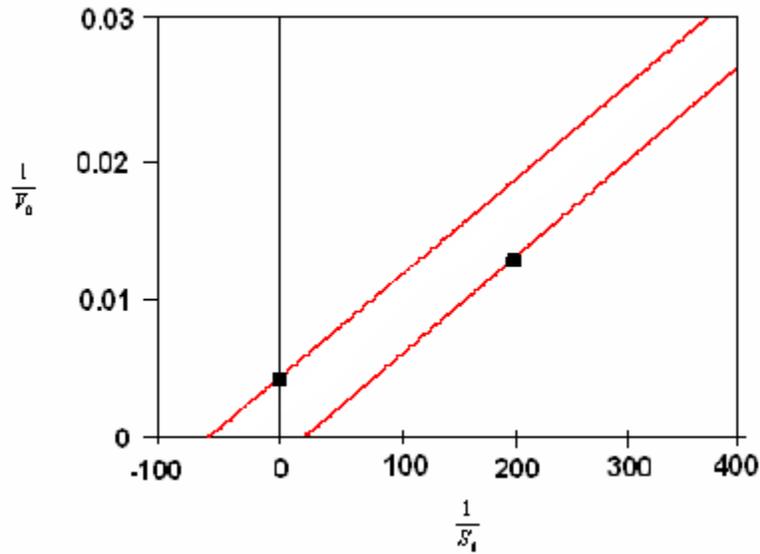
4.5 ETAPA 5 Tipo de inhibición

Para definir el tipo de inhibición presentada se procedió a graficar en coordenadas inversas de Lineweaver-Burk los datos obtenidos de las cinéticas de reacción utilizando diferentes concentraciones del inhibidor, arrojando los siguientes datos:

Sistema	K_M	$V_{m\acute{a}x}$
Sin inhibidor	2.90 E-4 M	1.11 E-4 M
$[I]_0$ 200μl	3.00 E-4 M	6.40 E-6 M

Cuadro 4: Datos de K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

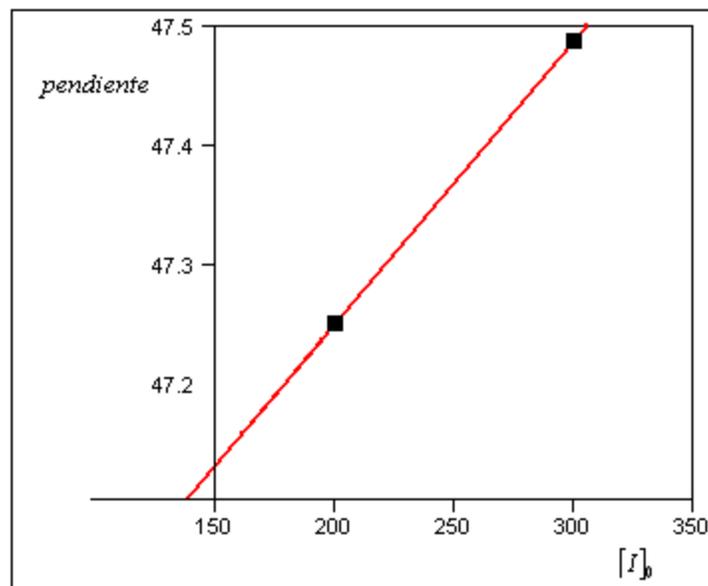
De donde es posible apreciar que la K_M se mantuvo constante, en tanto que la $V_{m\acute{a}x}$ disminuyó lo cual obedece a un comportamiento de inhibición acompetitiva, y es posible apreciar en el gráfico 9. En el cual se observa que no hay intersección ni el eje de las ordenadas ni de las abscisas debido a que la pendiente se mantiene constante, comportamiento característico del proceso inhibitorio anteriormente mencionado.



Gráfica 9: Inhibición acompetitiva.

4.5.1. Determinación de la constante de inhibición (K_i)

La constante de inhibición se calculó a partir de graficar el resultado de $K_M/V_{m\acute{a}x}$, en función a la $[I]_0$ teniendo que el valor obtenido de K_i , fue de $5.03 \text{ E-}5 \text{ M}$.



Gráfica 10: Constante de inhibición.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

5.1. Etapa 1 Precipitación con Acetona

De esta etapa es posible apreciar que tanto el contenido de proteína como la actividad enzimática total presentan valores significativos lo que indica que este es un buen agente para la desnaturalización reversible de la enzima para su posterior precipitación y separación del resto del extracto, a diferencia del tratamiento por altas concentraciones de sales (Sulfato de amonio) realizada en trabajos anteriores (Hernández, Barranco, 2003). En donde se observó baja actividad específica.

5.2. Etapa 2 Purificación de la Enzima Polifenoloxidasasa por Cromatografía en Columna con Resina Dowex-50 y Silicagel en Gránulos

En términos de actividad los dos sistemas de purificación: silicagel y Dowex-50, mostraron resultados muy similares. Sin embargo en términos de estabilidad las fracciones obtenidas con Dowex-50; mostraron mayor eficiencia que las fracciones obtenidas con silicagel, es decir los datos se mantuvieron constantes, durante periodos de almacenamiento más prolongados, mientras que con la silicagel hubo variaciones importantes que hicieron difícil su observación, ya que había de ser analizadas de inmediato para poder apreciar la actividad, tanto al purificar la PPO como el inhibidor obtenido a partir de la semilla de este, dicho fenómeno posiblemente es debido a la interacción ejercida

entre el soporte y la enzima durante la purificación, por lo cual se sugiere trabajar con Dowex-50 preferentemente.

5.3 Etapa 3 Determinación de Parámetros Cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la Enzima Polifenoloxidasas.

De acuerdo al seguimiento cinético presentado por la enzima estudiada se puede decir que esta sigue un comportamiento de tipo michaeliano.

Los valores reportados para K_M y $V_{m\acute{a}x}$, muestran una buena actividad para el sistema estudiado, aun cuando las condiciones de trabajo no fueron las idóneas, ya que estas son similares a las obtenidas por Nilo Rivas 1990, en condiciones de trabajo óptimas, para la PPO obtenida a partir del ocumo; lo que comprueba que la polifenoloxidasas es una enzima estable.

5.4 Etapa 4 Extracción y Aplicación de la Fracción con Capacidad Inhibitoria a partir de Semilla de Aguacate

Según lo observado durante el proceso de extracción y del seguimiento de la cinética de reacción, es posible decir que el inhibidor obtenido a partir de la semilla es de naturaleza proteica, ya que se precipitó como proteína y al hacer su cuantificación por el método de Bradford y adicionar mayores cantidades de proteína provenientes de este a la cinética de reacción, es posible obtener un porcentaje de inhibición mayor y disminución de las V_0 y V_{max} .

Al adicionar el inhibidor se observó una disminuyó considerable de la V_0 teniéndose hasta un 95.16% de inhibición (cuadro 3) lo cual, es un porcentaje elevado ya que al aplicar los inhibidores químicos comúnmente empleados (ácido cítrico, ascórbico, meta bisulfito de sodio, mezcla cinergista) se llega sólo a un 82.7% de inhibición (Hernández; Barranco, 2003).

5.5 Etapa 5 Tipo de Inhibición

De acuerdo con el comportamiento presentado al graficar en coordenadas inversas de Lineweaver-Burk se concluye que al adicionar el inhibidor se afecta la velocidad máxima calculada al incrementar la concentración del mismo 200 μl 6.4 E-6 M, 300 μl 3.38 E-6 M; mas la K_M aparente se mantiene constante 2.9 E-4 M y 3.0 E-4 M (gráfica 9), lo cual corresponde a un comportamiento de tipo acompetitivo, en donde el inhibidor no compite por el sustrato sino que se une al complejo ES formado para dar el complejo ESI, lo cual se puede comprobar al incrementar la concentración de S_0 y apreciar que el proceso inhibitorio no se ve afectado lo que es característico de este tipo de inhibición, ya que aun cuando el complejo ES se forme este no podrá disociarse liberando el producto formado y la enzima capaz de volver a unirse al S, para así continuar con el proceso (Lehninger, Albert L. 1976).

5.5.1. Constante de Inhibición (K_i)

La constante de inhibición fue de 5.03 E-5 M y nos presento un porcentaje de inhibición de 95.16%

CAPITULO 6

LITERATURA CITADA

1. Toporek, Milton. (1984). Bioquímica. 3ª Edición. Nueva editorial Interamericana, S. A. de C.V. México, D. F. pp 254.
2. Asociación americana de diabetes (2002). principios nutritivos basados en evidencia y recomendaciones para el tratamiento y la prevención de la diabetes y de las complicaciones relacionadas, (Evidence – based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications). Revisión anual de diabetes 2002. pp. 70 – 120.
3. Lehninger, Albert L. (1976). Curso breve de bioquímica. Ediciones Omega S.A. Casanova, 22, Barcelona. pp 34-37.
4. D, Miller Dennis. (2001). Química de alimentos, manual de laboratorio. Editorial Limusa Wiley S. A. de C. V. México, D. F. pp. 58-62.
5. Mertz, Edwin. (1978). Bioquímica. Editorial Publicaciones cultural, S. A. México, D. F. pp 93-110.
6. Harper, Harold A. (1980). Manual de química fisiológica. 17ª Editorial el manual moderno, S. A. México, D. F. pp 93-110.
7. Lehninger, Albert L. (1995). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª ediciones omega, S. A. Barcelona. pp 189-218.

8. Bhagaran, N. V. (1983). Bioquímica. Nueva editorial interamericana, S. A. de C. V. México, D. F. pp 86-107.
9. Bender, Arnold E. (1990). Nutrición y tecnología de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp 117-120.
10. Robinson, David S. (1991). Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp 469-480.
11. Devlin, Thomas M. (1992). Biochemistry. 3ª Ed. Wiley – Liss. pp 135-138.
12. Sánchez, P. José. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill) y otras especies afines. Revista Chapingo serie horticultura 5: 7-18.
13. Barrientos Priego, A. F. et al. (1992). Study of the avocado germplasm resources, 1988- 1990. IV Findings in the Mexican Gulf region. Proc. of Second World Avocado Congress 1992. pp 551-558.
14. Ben Ya'acov, A., et al. (1992). A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I.- General description of the international project and its findings. Proc of Second World Avocado Congress 1992. pp 535-541.
15. Bergh, B.; N. Ellstrand. (1986). Taxonomy of the avocado. Calif. Avocado Soc Yearbook 70: 135-145.
16. Bergh, B. O. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. Calif Avocado Soc Yearbook. 76: 61-75.
17. Gama, C. L.; A. Gómez P. (1992) An Ethnoecological Approach for the Study of *Persea*: A Case Study in the Maya Area. Proc of Second World Avocado Congress 1992. pp 11-17.

18. Schieber, E.; Zentmyer, G. A. (1992). Archeology of the Avocado in Latin America. Proc of Second World Congress 1992. pp49.
19. Storey, W. B.; B. Bergh; G.A. Zentmyer. (1986). The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. Calif Avocado Soc Yearbook Vol 70: 127-143.
20. Grant, Wilson C. (1960). Influence of Avocado on serum cholesterol. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 104: 45-47.
21. Alvisouri, M. Carranza, J. Herrera, J. Chávez, F. and Amescua J. L. (1992). Effects of Avocado as a source of Monounsaturated Fatty acids on plasma lipid levels. Arch of Med. Res. 23: 163-167.
22. Braverman, J. B. S. (1980). Introducción a la bioquímica de los alimentos. Editorial Omega, S. A. Barcelona, España.
23. Cheftel, J. C.; Cuq y D. Lorient. (1989). Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
24. Eskin, N. A. M., Henderson; R. J. Townsend. (1990). Biochemistry of food. London academia press. pp239.
25. Alais, C.; Linden G. (1990). Manual de bioquímica de los alimentos. Editorial Masson, S. A. Barcelona, España.
26. Wong, S. D. W. (1995). Química de los alimentos: mecanismos y teoría. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp 230-235.
27. Belitz, H. D. y Grosch W. (1997). Química de los alimentos. 4ª edición. Editorial Acribia, S. A Zaragoza, España.

28. Coultate, T. P. (1998). Manual de química y bioquímica de los alimentos. 3ª edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
29. Robinson, D. S. (2000). Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
30. Fennema, O. R. (2000). Química de los alimentos. 2ª edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
31. Cheftel, J. C. y Cheftel H. (2000). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Volumen 1, 4ª edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
32. Durán, B. Ricardo. (1999). Aguacate: un producto con potencial comercial. Revista mercados internacionales. Trópico 1 Junio de 1999.
33. Morales, O. (1994). El cultivo del aguacate. En: frutas tropicales (memorias de curso). ICA-CORPOICA. pp90-96.
34. Benjamín, N. D. M. W. Montgomery. (1973). Polyphenol oxidase of royal Ann cherries. Purification and characterization. J. Food Sc. 38:799. Slices: Partial purification and properties. Phytochemistry. 3:65.
35. Gregory, R. P. F. and Bendall D. S. (1966). The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.) Biochem. J. 101: 569.
36. Griffiths, L. A. (1959). Detection and identification of the polyphenol oxidase substrate of the banana. Nature 184:58.
37. Knapp, F. W. (1956). Browning enzymes of eggplant. Fla. State Hort. Soc. 74:256.

38. Lineweaver, H.; Burk D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants J. Am. Chem. Soc. 56:685.
39. Wong, T. C., B. S. Luh and J. R. Whitaker. (1971). Isolation and characterization of Polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. Plant Physiol. 48:19.
40. Guadarrama, A., N. Rivas. (1990). Purificación y caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasas del ocumo (*Xanthosoma sagittifolium*). Revista de la facultad de agronomía. 16: 65-68.
41. Laborem, G. (1994). Resultados preliminares en el estudio de la calidad del fruto de guanábano. Revista Fonaiap – Divulga. Enero – Junio: 32-34.
42. Lima, S., N. Barbosa; A. Sonza. (1994). Polyphenol oxidase activity, polyphenols concentration and browning intensity during soursop (*Annona muricata* L.) maturation. Journal of science. 59: 1050-1052.
43. Márquez, L., A. Fleuriet; J. Cleyet; J. Jacques. (1994). Purification of an apple polyphenol oxidase isoform resistant to SDS- proteinase K digestion. Phytochemistry. 36: 1117-1121.
44. Mayer, A. (1982). Polyphenol oxidase in plant. Recent Progress. Pytochemistry 26: 11-19.
45. Ngalani, J., A. Signoret; J. Crouzet. (1993). Partial purification and properties of plantain polyphenoloxidase. Food chemistry. 48: 341-347.
46. Oktay, M., J. Kufrevioglu; I. Kocacaliskam; H. Sakiroglu. (1995). Poliphenoloxidase from Amaya apple. Journal of food science. 60: 494-496.

47. Pathak, S., S. Karyekar; V. Ghole; M. Hedge. (1992). Effect of activation methods on affinity chromatography of potato polyphenoloxidase. *Phytochemistry*. 31: 1481- 1483.
48. Zhou, H., X. Feng. (1991). Polyphenoloxidase from yali peach (*Pyrus bretschneideri*). *Science of food and agriculture*. 57: 307-313.
49. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.
50. Flores, A. (1994). Manejo y postcosecha de frutas y hortalizas. Experiencias y recomendaciones. Editorial UNELLEZ. San Carlos, Venezuela. pp 319.
51. Adams, J. B.; H. A. W. Blundestone. (1971). Canned fruits other than citrus. In: Hulme A. C. ed. *The biochemistry of fruits and their products*. London, academic press. Volume 2. 507-541.
52. Corse, J. (1964). The enzymatic browning of fruits and vegetables. In: Runeckles, V. C. ed. *Phenolic in normal and diseased fruit and vegetables*. Montreal. Imperial tobacco Co. pp 41-62.
53. Buchilloux, S. (1962). Enzymatic browning reaction. In: Runeckles, V. C. ed. *Phenolic in normal and diseased fruit and vegetables*. Montreal. Imperial tobacco Co. pp 1-14.
54. Kertesz, D., R. Zito. (1957). Polyphenoloxidase purification and molecular properties. *Nature*. London. 179: 1017-1018.

55. Paschoalino, J. E. (1978). Aspectos sobre o escurecimento do palmito durante o procesamento. Boletín do instituto de tecnologia de alimentos. Campinas. 56: 175-181.
56. Silva, E. Nogueira, J. N. (1984). Estudo da actividade da polifenoloxidase e da preoxidase em algumas frutas hortalicas. O solo, Piracicaba, So, 76 (1): 43-45.
57. Desrorier, Norman W. (1989). Elementos de tecnologia de alimentos. Compañía editorial Continental, S. A. de C. V., México, D. F. pp. 80-86, 62-68.
58. Farias, M. Guillermo. (1972). Manual de bioquímica. Universidad Autónoma de Guadalajara. pp 229.
59. Edelman, J., Chapman J. M. (1982). Bioquímica básica. Un enfoque visual para estudiantes de bachillerato y de Universidad. Compañía editorial Continental, S. A. de C. V. México. pp 50-55.
60. Khan, V. (1977). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocados varieties differing in their browning rates. J. Food Sci. pp 38-42.
61. Khan, V. (1985). Effect of proteins, protein hidrolizate and aminoacids on o-hidroxiphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom and avocado. J. Food Sci. pp 111-115.
62. Ponting, J., M. A. Joslyn. (1948). Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Arch. Biochem. pp19-25.

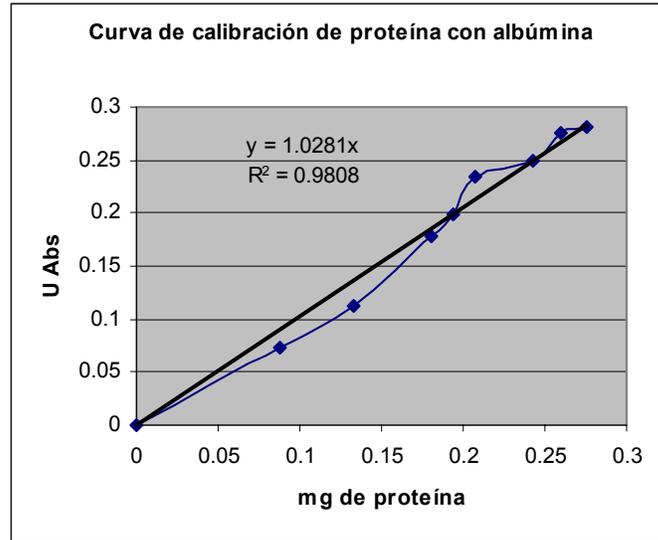
63. Rivas, N. (1978). Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenoloxidasa del cambur manzano. *Revista de la Facultad de Agronomía Maracay* 4: 39-49.
64. Rivas, N; J. R. Whitaker. (1973). Purification and some properties of two polyphenol oxidase from Barlett pears. *Plant Physiol.* 52: 501-507.
65. Thomas, P; M. Janave.(1973). Polyphenol oxidase activity and browning of mango fruits induced by gamma irradiation. *J. Food Sci.* 38: 1149-1152.
66. Wisseman, K. W; M. W. Montgomery. (1985). Purification of d Anjou pear (*pirus communis*) polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 78: 256-262.
67. Whitaker, J. R. (1972). *Principles of enzymology for the food science.* New York Marcell Decker, Inc pp 636.

APENDICE

CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNA CON ALBÚMINA METODO

BRADFORD

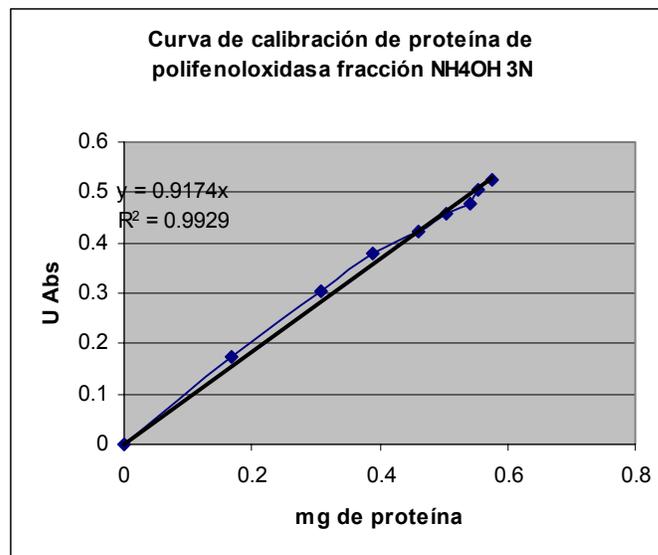
0	0
0.088	0.074
0.133	0.113
0.181	0.179
0.194	0.198
0.207	0.235
0.243	0.249
0.26	0.276
0.276	0.282



CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA FRACCIÓN

NH₄OH 3N Dowex-50

0	0
0.168	0.173
0.307	0.302
0.388	0.378
0.462	0.423
0.503	0.458
0.541	0.476
0.554	0.504
0.576	0.524



**CURVA DE CALIBRACIÓN DE INHIBIDOR POR EL MÉTODO
BRADFORD FRACCIÓN ACETONA Dowex-50**

0	0
0.061	0.046
0.117	0.11
0.19	0.177
0.26	0.242
0.346	0.337
0.441	0.42
0.511	0.524
0.576	0.555

