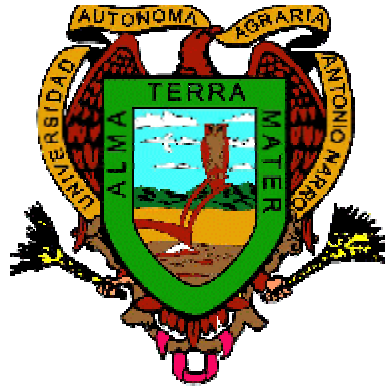


**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL



**Extracción y Evaluación de Compuestos con Capacidad Inhibitoria
del Proceso de Obscurecimiento Enzimático de Aguacate Hass Persea
americana variedad mill, obtenidos de la semilla del fruto.**

Por:

FRANCISCO JAVIER BARRANCO CONTRERAS

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2003

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

**Extracción y Evaluación de Compuestos con Capacidad Inhibitoria
del Proceso de Obscurecimiento Enzimático de Aguacate Hass Persea
americana variedad mill, obtenidos de la semilla del fruto.**

TESIS

**Presentada por:
FRANCISCO JAVIER BARANCO CONTRERAS**

**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. Maria Hernández González
Asesor principal**

**M.C. Xochitl Rúelas Chacón
Vocal**

**M.C. Oscar N. Reboloso P.
Vocal**

**PhD. Ana Iliná
Vocal**

**Ing. Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de Ciencia Animal**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Mayo de 2003**

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por haberme permitido formarme como profesionista y con la ayuda de sus maestros.

Al **Departamento de Nutrición y alimentos** y maestros que lo integran por haberme brindado su confianza y apoyo, así como a los **Profesores de la Carrera de Ciencia y Tecnología de Alimentos**.

A la **M.C. Maria Hernández Gonzáles**, por brindarme su confianza y la oportunidad de haber trabajado con ella, para llevar a cabo el presente proyecto.

A la **M.C. Xochitl Rúelas Chacón**, al haber contribuido con el presente trabajo, y brindarme su apoyo.

Al **M.C. Oscar N. Reboloso Padilla**, por haber formado parte en el presente trabajo y darme confianza.

A la **PhD. Ana Iliná**, por darme su apoyo para sacar adelante el presente trabajo, y formado parte del presente jurado.

A la **Lic Laura Olivia Fuentes Lara**, por su amistad y apoyo de la realización de este trabajo en su laboratorio.

A **mis amigos** José Alberto, Memin, Javier, Cuco, Pablo, Spider-man, Juanelo, Raúl, José Luis, Conrado, Rubi, **T.L.Q.** Carlos Arévalo Sanmiguel, Rubén (chispa), Bruno, Novio, Zurdo, Tito, Doña Sara, Chuya, por su amistad y por los buenos y malos momentos de convivencia que pasamos juntos.

A **mis compañeros de generación** de ing. En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

DEDICATORIA

A **dios**, por haberme permitido realizar mi sueño, que nunca me dejó solo, siempre me guió por el buen camino a seguir adelante para y ser alguien en la vida.

A mis padres **Isaura y Juan**, por su apoyo incondicional en mi vida, por que siempre creyeron en mi, y me dieron la oportunidad de estudiar.

A **mis hermanos** (Gerardo, Catalina, Esther, Angélica, Antonio, Ricardo, Araceli), por su apoyo, comprensión que en todo momento los tuve conmigo, los quiero.

A mi **Tio** Fulgencio y **Abuelita** Aurelia (†), por creer en mi y tenerme paciencia.

A **mis cuñados y cuñadas** Victoria, Lidia, Gilda, Anselmo, Oscar, Humberto, Ricardo, por su apoyo, su confianza y consejos que me ayudaron a salir adelante.

A **mis sobrinos** que los quiero mucho.

A **Lupe** por el apoyo moral y comprensión, que en todo momento me diste tu apoyo gracias.

A **Mirna**, por el cariño, comprensión y apoyo que me has brindado, gracias por haberme entendido en todo momento.

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1.	Análisis nutrimental de pulpa de aguacate hass.....	15
Cuadro 2.	Materiales utilizados en laboratorio.....	32
Cuadro 3.	Equipos de laboratorio utilizados.....	33
Cuadro 4.	Resultados de caracterización de los extractos.....	39
Cuadro 5.	Estudio de la velocidad de reacción en función a la concentración de enzimas.....	40
Cuadro 6.	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PPO del aguacate hass(<i>persea americana</i> variedad <i>mill</i>).....	43
Cuadro 7.	Efecto de diferentes inhibidores químicos a concentraciones variables, sobre la actividad de la PPO del aguacate Hass (<i>persea american</i> variedad <i>mill</i>).....	45
Cuadro 8.	Efecto de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate y de pulpa de semilla de aguacate sobre la actividad de la PPO del aguacate Hass (<i>Persea americana</i> variedad <i>mill</i>).....	48
Cuadro 9	Efecto de los extractos aplicados a pulpa de aguacate Hass (<i>Persea americana</i> variedad <i>mill</i>), en fresco.....	53

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Imagen del aguacate.....	6
Figura 2	Producción mundial de aguacate.....	11
Figura 3	Oxidación de catecol.....	20
Figura 4	Proceso de hidroxilación y oxidación. de la PPO.....	23
Figura 5	Proceso de reducción de o-quinonas.....	25
Figura 6	Representación de la concentración en cuanto actividad total.....	40
Figura 7	Representación de actividad de la PPO extraída del aguacate en función a la temperatura.....	43
Figura 8	Comparación de efecto inhibitorio de 1-m-bisulfito, 2- ácido ascórbico, 3- mezcla de ácido ascórbico y cítrico aplicable.....	45
Figura 9	Comparación de extracto de semilla y extracto de pulpa de semilla sobre la actividad de PPO aguacate Hass (<i>Persea americana</i> variedad <i>mil</i>)	49

RESUMEN

El aguacate hass, (*persea americana* variedad *mill*), es de gran interés en la industria alimentaria por poseer una gran riqueza en grasas, proteínas y vitaminas esta clasificado entre los mas nutritivos, un porcentaje elevado, es consumido en fresco principalmente, debido a su pronto deterioro. Se ha determinado que dicho proceso se debe a reacciones bioquímicas de oscurecimiento enzimático y auto oxidación, este problema se presenta durante el procesamiento y la post – cosecha, dicha condición es presenta en vegetales ricos en compuestos fenólicos.

Se han utilizado diferentes técnicas tratando de reducir el proceso de oscurecimiento enzimático. En el presente trabajo de investigación se muestra la obtención y evaluación de compuestos con capacidad inhibitoria en el proceso de oscurecimiento enzimático obtenidos de semilla de aguacate.

Para lograr dicho objetivo se emplearon técnicas para determinar las condiciones de trabajo del enzima responsable del proceso, encontrándose que la temperatura óptima oscila 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 μ M de la mezcla de ácido cítrico y ascórbico (50-50) alcanzando un grado del 83.9%., mientras que a la misma concentración el ascórbico, y el m-bisulfito de sodio presentaron un 77.5% y un 63.7% de inhibición de la actividad, respectivamente.

Se observó que en presencia de inhibidores químicos la cinética del proceso en cuestión presenta un periodo lag.

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 Hass, lo cual fue medido espectrofotometricamente y comparado con los valores obtenidos del uso de la enzima en ausencia de estos extractos dichos porcentajes son de 95.28 y 94.52% para el extracto obtenido a partir de pulpa de semilla y de semilla completa respectivamente, dichos valores son mayor que los observados en presencia de los compuestos químicos anteriormente mencionados a 0.9mM.

Finalmente en estudios 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 6 horas que es 18 veces mayor que en el control sin adición de extractos.

INDICE GENERAL

	Pag.
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
INDICE DE CUADROS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACION.....	4
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivo específico.....	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Origen del aguacate.....	6
2.1.1 Historia del aguacate.....	8
2.2 Distribución geográfica.....	9
2.2.1 Distribución nacional.....	9
2.2.2 Distribución mundial.....	10
2.3 Importancia económica.....	10
2.3.1 Importancia mundial.....	10
2.4 Grupos ecológicos.....	12
2.5 Clasificación taxonómica.....	12
2.6 El fruto de aguacate.....	13
2.6.1 Composición química del aguacate.....	13
2.7 Importancia del aguacate en la salud humana.....	16
2.8 Conservación de aguacate.....	16
2.9 Importancia del aguacate para nuestro pueblo.....	17
2.10 Tipos de oscurecimiento en alimentos.....	18
2.10.1 Pardeamiento no enzimático de alimentos.....	19
2.10.2 Pardeamiento enzimático de alimentos.....	19
2.11 Oscurecimiento del aguacate.....	20

2.12 Funciones de los poli fenoles en los vegetales.....	22
2.12.1 La polifenoloxidasas.....	22
2.12.2 Características de la enzima PPO.....	24
2.12.3 Productos secundarios de formación.....	24
2.12.4 Mecanismo de oxidación.....	26
2.12.5 Importancia de la polifenoloxidasas. (PPO).....	27
2.12.6 Formas para inhibir la acción de la PPO.....	27
2.12.7 Investigaciones acerca del estudio de la polifenoloxidasas	29
III MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1 Etapas de investigación.....	31
3.2 Localización.....	32
3.3 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio.....	32
3.4 Material vegetal.....	34
3.5 Extracciones.....	34
3.5.1 Extracción de la enzima.....	34
3.5.2 Extracción de compuestos con actividad inhibitoria de la PPO, a partir de semilla de aguacate.....	35
3.6 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima.....	35
3.6.1 Determinación del contenido proteína	36
3.7 Caracterización de las condiciones optimas para la actividad enzimática.....	36
3.7.1 Estudio de la variación de la actividad enzimática en función de concentración de enzima.....	37
3.7.2 Efecto de temperatura.....	37
3.8 Efecto de los inhibidores.....	37
IV RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
4.1 Obtención de extractos a partir de pulpa y hueso de aguacate Hass (<i>Persea americana</i> variedad <i>mil</i>).....	38
4.2 Estudio de la variación de la actividad enzimática en función a la concentración de enzima.....	39
4.3 Efecto de la temperatura.....	42
4.4 Estudios del proceso inhibitorio.....	44

4.4.1	Proceso de inhibición con aditivos químicos.....	44
4.4.2	Inhibición de PPO mediante adición de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate Hass(<i>persea americana</i> variedad <i>mill</i>).....	48
4.5	Aplicación en fresco de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate hass (<i>persea americana</i> variedad <i>mill</i>).....	52
V	CONCLUSIONES	54
	LITERATURA CITADA	56

1. INTRODUCCIÓN

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

El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) deriva de la palabra nativa “aoacatl” o “ahuacatl” conocido también con otros nombres típicos de las regiones de origen. Se determinó que la planta es originaria de México y se ha expandido a otros lugares. La producción en nuestro país se encuentra principalmente en siete estados. El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) difiere de otros frutos en fresco en cuanto a su contenido bromatológico, ya que posee una gran riqueza en grasas, proteínas, vitaminas y otros componentes, así como un elevado valor calórico por lo que se clasifica entre los más nutritivos (Álvarez, 1971).

El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) es muy apreciado por los mexicanos en su dieta. Un 95% de la producción es consumida en fresco, debido a que su conservación por periodos de tiempo prolongados presenta un proceso de oscurecimiento de tipo enzimático Sánchez (2000). Oscurecimiento enzimático es también presentado por la mayoría de las frutas y hortalizas durante

su procesamiento y post – cosecha, lo cual dificulta la obtención de productos derivados de estos para su consumo Mayer (1989).

Dicho oscurecimiento se debe principalmente a la presencia de la enzima polifenoloxidasas (E.C.1.14.18.1) que pertenece al grupo de las oxidoreductasas, la cual en presencia de oxígeno cataliza dos diferentes reacciones: la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de o-difenoles a o-quinonas Whitaker (1972). Estas polimerizaciones dan como resultado pigmentos cafés, rojos o negros. Se reporta también que el proceso de oscurecimiento puede ser debido a otras enzimas como la peroxidasa, pectinesterasa, poligalacturonasa, etc Nilo (1977).

Así, la posibilidad de contar con métodos sencillos y económicos para su conservación en fresco, sin alterar sus propiedades nutritivas y características organolépticas es de gran interés. Actualmente para retardar dicho proceso se utilizan diferentes métodos como es la adición de algunos compuestos químicos: el ácido ascórbico, el ácido cítrico y los sulfitos, Nilo (1997), los cuales actúan solo por periodos cortos y afectan el sabor característico del producto. También se han empleado otros métodos como es la exposición a altas presiones hidrostáticas y la termoinactivación, los cuales afectan directamente las características organolépticas y nutrimentales del producto, y requieren de equipos sofisticados y costosos.

El uso tradicional de la semilla del mismo fruto en fresco es la base sobre la cual se propuso este trabajo, lográndose obtener extractos del mismo, los cuales fueron utilizados en fresco y bajo un seguimiento cinético al espectrofotómetro comparándose con los aditivos químicos comúnmente empleados.

Sin duda alguna, son muchos los trabajos acerca de esta enzima, mayoría encaminados a la extracción y caracterización de la misma y pocos los que se enfocan en propuestas para inhibición de su actividad para el proceso de oscurecimiento. Sin embargo, la solución de este problema es un gran reto para la industria alimentaria.

1.1 JUSTIFICACIÓN

El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*), es un fruto muy apreciado por los consumidores mexicanos. En su dieta es consumido en diversas formas (ensaladas, sopas, guisados, postres, bebidas). Sin embargo, el consumo 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 lo es el oscurecimiento enzimático. Por esta razón, su comercialización en forma de procesado se ve disminuida, de tal manera que el producto tiene que ser consumido al instante. Este problema es también causado por daños mecánicos durante el almacenamiento y la post - cosecha.

Con este trabajo se pretende buscar un conservador de origen natural que permita retardar dicho proceso sin alterar significativamente sus propiedades nutritivas y características organolépticas, prolongando así su periodo de vida y haciendo posible su procesamiento.

En calidad de materia prima que se pretende utilizar para la producción de este conservador se considera la semilla del mismo fruto la cual es un desecho del procesado de aguacate. Esto permite obtener un producto con valor económico agregado a partir de materia prima que actualmente no se utiliza para fines prácticos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener y evaluar compuestos con capacidad inhibitoria del proceso de obscurecimiento enzimático en aguacate Hass “*Persea americana* variedad *mill*”, a partir de extractos de su semilla.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener el extracto que contenga a la enzima PPO para determinar su actividad, a partir de pulpa de Aguacate Hass “*persea americana* variedad *mill*”.
- Extraer los compuestos, con capacidad inhibitoria del proceso de obscurecimiento enzimático, a partir de la semilla de aguacate Hass “*Persea americana* variedad *mill*”.
- Evaluación espectrofotométrica de la cinética de reacción mediada por PPO de aguacate Hass “*Persea americana* variedad *mill*”, en presencia de compuestos químicos comúnmente empleados para inhibir su efecto.
- Evaluar espectrofotométrica de la cinética de reacción mediada por PFO obtenida a partir de aguacate Hass “*Persea americana* variedad *mill*”, en presencia de los extractos obtenidos a partir de la semilla de este.
- Aplicar y evaluar el efecto inhibitorio producido por los extractos obtenidos de la semilla de aguacate Hass “*Persea americana* variedad *mill*” en pulpa de aguacate en fresco.

Capítulo 2

REVISION DE LITERATURA

2.1 Origen del Aguacate

El nombre de aguacate (*Persea gratissima*, *Persea americana*) deriva de la palabra nativa "aoacatl" o "ahuacatl" y recibe otros nombres como "palta" en Sudamérica (Solares, 1976), "avocado" o "avocado pear", en la lengua inglesa, "avocatier" en francés, "abacate" en portugués, "on" en Maya, "cupanda" en Tarasco, "avogadobaum" en Alemán, "pagua" o "pahua", en Centro América durante el apogeo del imperio inca. En la figura 1 se puede observar el fruto del aguacate.

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

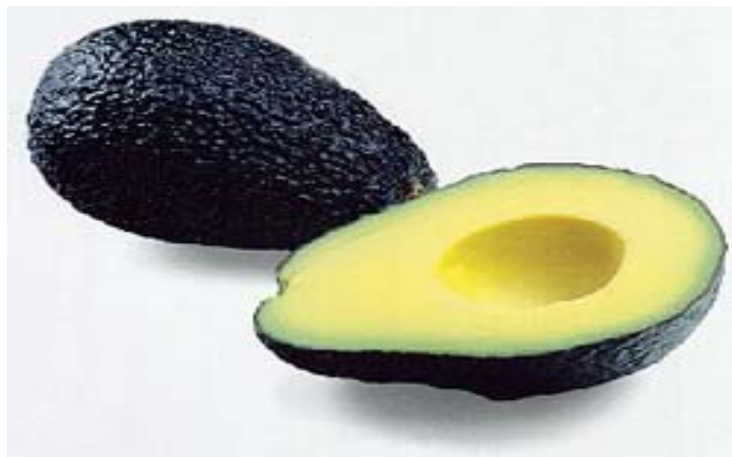


Figura.1. Imagen de aguacate

Los aztecas llamaban "ahuacaquahuitl" al árbol y "ahuacátl" al fruto por su forma y manera de colgar, comparandolo con el testículo que en el mismo idioma se conocía como "ahuacátl" (Fersini, 1975).

El centro de expansión de la palnta fue México, distribuyéndose del centro hacia el sur de América y posteriormente a la colonización, llegando a otros puntos fuera del continente (Rodríguez, 1982).

Los primeros pobladores de América central y del sur y del área central de México probablemente domesticaron al aguacate al descubrir su exquisito sabor.

Cuando los españoles invadieron los imperios Aztecas e Incas, durante la primera parte del siglo XVI, encontraron el aguacate ya distribuido desde México hasta el Perú y al este de Venezuela, Sir Hans Sloane en su catálogo de plantas de Jamaica, publicado en 1696, menciona esta fruta como “aguacate” o “pera” de cocodrilo (Hernández, 1972).

En los bosques, selvas con clima tropical, subtropical, templado ó calido de centro América, sureste de México y los bosques macizos montañosos centrales de México se encuentran diferentes variedades conocidos como aguacatillos, que son considerados como antecesores de todas las variedades de aguacate (Solares, 1976).

2.1.1 Historia del aguacate.

Hasta 1963 en México, estuvo predominando la variedad criollo selecto y los estados productores más importante eran Puebla, Veracruz y Michoacán. A partir de esta fecha, la variedad del criollo dejó de ser importante, siendo reemplazada por variedades mejoradas, entre las cuales sobresalieron el Fuerte y el Hass. Este cambio se llevó a cabo en el estado de Michoacán, iniciándose en

1961, cuando el Instituto Mexicano del Café propició el establecimiento de diversos cultivos en el Estado, con el fin de moderar la expansión del café y proteger sus precios en el mercado internacional.

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

De 1979 en adelante, se registró un creciente proceso de concentración regional de la producción, junto con una tendencia al predominio de una sola variedad.

El Hass es una variedad comercial obtenida de una rigurosa selección a partir de la variedad guatemalteca.

El uso potencial del aguacate es como materia prima para productos procesados (Lime, 1969a,b; Gómez y Bates, 1970; Cortes et al., 1971; Lladser y Piñanga, 1975; Scudomore –Smith, 1984) o como fuente de aceite para alimentos y cosméticos (Swisher, 1988).

Los principales países productores de las variedades Hass y Fuerte, que abarcan cerca del 99% del comercio exterior, requieren de investigaciones industriales sobre usos y derivados para mejorar la utilización y comercialización.

No obstante, este fruto sigue siendo considerado como alimento *gourmet* en varios países, por lo que los exportadores vienen adelantando campañas promocionales que les permitan estimular y masificar el consumo, especialmente en los mercados de Europa y Estados Unidos.

2.2 Distribución Geográfica

2.2.1 Distribución Nacional

De los centros de origen del aguacate en el sur de México, se ha extendido a toda la Republica Mexicana con excepción de los estados de Chihuahua y Baja California Norte. La producción de aguacates en nuestro país, se encuentra localizada en siete estados, principalmente Michoacán, Puebla, México, Morelos, Nayarit, Guerrero y Sinaloa los cuales en conjunto concentran el 96% de la superficie y de la producción nacional.

2.2.2 Distribución Mundial

El área de aguacate incluye a los países de Centro y Sudamérica (Paraguay, Perú, Brasil, Chile, El Caribe, México, Colombia y Guatemala), algunas regiones de Norteamérica (Florida y California) todo el continente Africano, China,

Indonesia, Filipinas, Hawai y las Canarias (Fersini, 1975), sur de España, Francia, Polinesia, Tahití e Islas Madera (Brom y Carvalho, 1966).

Los principales países importadores de esta área son: Inglaterra, Francia, Alemania, Italia, Bélgica, países Bajos, Dinamarca, Suecia y Noruega. Dentro de los principales exportadores para esas regiones se encuentran: Israel, África del sur, Martinica, Camerún y España.

2.3 Importancia Económica

2.3.1 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.

Como se muestra en la figura 2 en 1997 se produjeron aproximadamente 2.3 millones de toneladas. Seis países producen las dos terceras partes del total mundial, siendo México es el mayor productor, que participa con el 34% del volumen total, Indonesia (10%), Colombia (8,6%), Estados Unidos (7,7%), República Dominicana (6,7%), Brasil (4,7%) e Israel (3,7%).

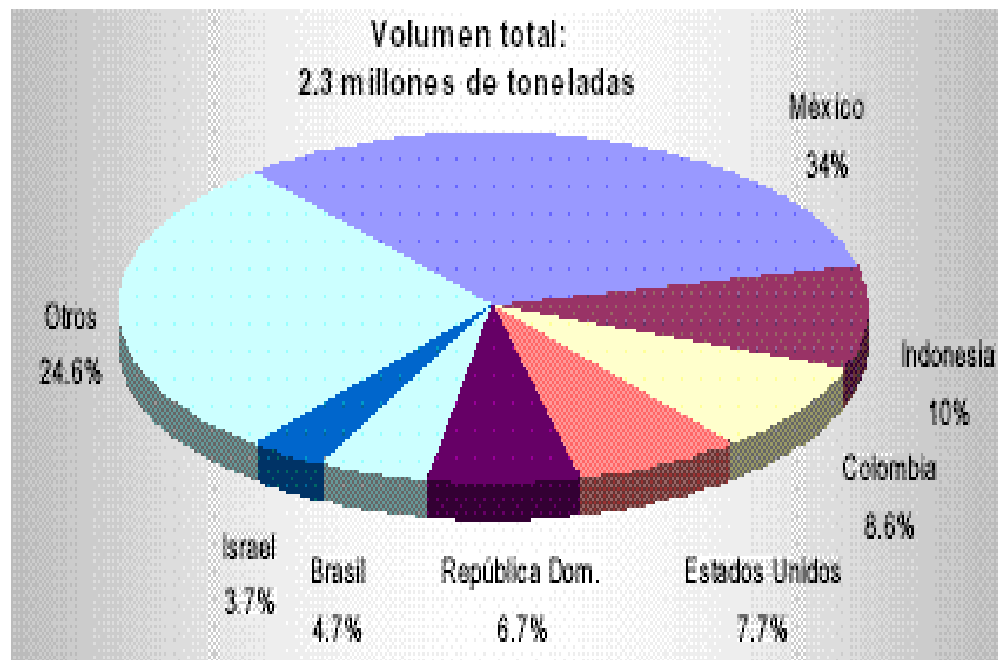


Fig. 2. Producción mundial de aguacate.

La importancia del aguacate en el mercado internacional ha dejado de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta de muchos países. A nivel mundial en los últimos 15 años se ha incrementado 550, 000 toneladas contando con un gran mercado para consumo en fresco.

2.4 GRUPOS ECOLOGICOS

Desde el punto de vista botánico y agronómico se han clasificado mas de 500 variedades del fruto, sin embargo la mayor parte han sido descartadas debido a problemas de productividad, calidad y manejo comercial, solo tres son consideradas las mas reconocidas:

- Persea gratissima
- Persea americana
- Persea drymifolia

Cada una corresponde a los tres tipos ecológicos universalmente aceptados (Antillana, Guatemalteca, Mexicana) (Solares, 1976).

La mexicana, es originaria de los valles de México, de regiones con altura de 1 500 a 2 000 m.s.n.m.; la guatemalteca originaria de Guatemala, de zonas con altura de 500 a 1 000 m.s.n.m. y la antillana, cuyo país de origen no ha sido precisado, en lugares con menos de 500 m.s.n.m.

2.5 Clasificación Taxonómica Según Weegahd y Fersini (1975)

Reino – Vegetal

Subreino – Fanerógamas

División - Spermatophita

Clase – Dicotiledónea

Subclase – Diapétalas

Orden – Ranales

Familia – Lauráceae

Genero – Persea Especie – spp.

2.6 El Fruto del aguacate

El fruto de aguacate es variable en tamaño según el tipo ecológico, forma, color, composición química, sabor y consistencia (figura1).

Este siempre es una baya carnosa, ovalada, periforme, redonda o elíptica, monospera, con pulpa de consistencia de carne de membrillo hasta la suave de la mantequilla, coloreada en amarillo claro al interior y verduzco hacia el exterior, casi inodoro y sabor algo parecido al de avellana (Fersini, 1975). Se reporta en cuestión no contienen taninos, la materia grasa es un aceite verde asociado a una resina con un contenido de ácido fosfórico casi de 13 %. Hernández (1967)

2.6.1 Composición Química del aguacate

El aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*), posee valiosas propiedades alimenticias que difieren de las de cualquier fruto para consumo en fresco, contiene gran riqueza en grasas, del 6 al 30 % del peso de la pulpa (Person, 1975), siendo el componente principal los ácidos grasos monoinsaturados (oleico, palmítico, linoléico y palmitoléico, esteárico en pequeñas cantidades) (Swisher, 1988). Su contenido en proteínas varía entre un 5 a 6%, lo que le permite ser clasificado entre los frutos más ricos en dicho componente, con alto contenido de vitamina A y B, medio de vitaminas D y E y pobre en vitamina C. Se reporta que estos niveles dependen fuertemente en la variedad (Hall et al., 1955).

El aguacate posee valores calóricos elevados, 2300 calorías por kilogramo, lo cual es mucho mayor que el de los frutos en general que es de 385 kc en promedio según reporta el análisis de Jeffat Goss. El coeficiente de digestibilidad del aguacate es idéntico al que presenta la grasa de la leche de acuerdo a estudios de digestibilidad.

En el cuadro 1 se presentan las características químicas y nutricionales de la pulpa de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) (Téliz, 2000), que en forma cuantitativa demuestran que beneficios puede proporcionar el consumo de este alimento para el organismo humano.

Cuadro. 1. Análisis de 100 gr. de pulpa de aguacate Hass

Fibra	0.4 g
Carbohidratos	5.9 g
Proteínas	1.8 g
Grasa total	18.4 g
Ácidos grasos	
<ul style="list-style-type: none"> • Saturados • Monoinsaturados • Poliinsaturados 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.0 g • 8.9 g • 2.0 g
Retinol (A)	17.0 mg

Tiamina	0.10 mg
Riboflavina	0.10 mg
Niacina	1.8 mg
Vitamina C	15.0 mg
Vitamina E	1.53 mg
Vitamina B6	0.25 mg
Folate	10.0 %
Ácido pantoténico	0.87 mg
Calcio	24.0 mg
Hierro	0.5 mg
Magnesio	45.0 mg
Sodio	4.0 mg
Potasio	604.0 mg
Zinc	0.42 mg

Daniel Téliz, 2000, El Aguacate y su manejo integrado, Cuadro 1.3 pp.7

2.7 Importancia del Aguacate en la Salud Humana

El aguacate tiene propiedades benéficas a la salud (Smith et al., 1983; Wills et al., 1986; Colquhoun et al., 1992), de ahí el creciente interés por su consumo, atribuido principalmente al alto contenido de proteínas y grasas. Una característica extraordinaria de éste, es su efecto benéfico adicional al ayudar a eliminar el colesterol dañino, al promover un aumento en las lipoproteínas de alta densidad y reducción de triglicéridos en ayuno, que consiste en la capacidad de reducir el riesgo de desarrollar aterosclerosis y mejorar las condiciones en pacientes con asma y con artritis reumatoides.

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

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

2.8 Conservación de Aguacate

Los aguacates se conservan y transportan en condiciones a temperaturas no menores a los 4.5 °C ni superiores a los 10°C, en atmósfera con un 85% de humedad y, de ser posible, con un porcentaje de anhídrido carbónico del 3%, superior al normal de la atmósfera. Si se conservan a temperaturas inferiores suelen sufrir alteraciones: su color cambia a pardo ó negro, y el sabor de la pulpa y su olor se vuelven desagradables.

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

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

2.9 Importancia del Aguacate para Nuestro Pueblo

El aguacate es un fruto tropical y subtropical muy apreciado por los mexicanos. Sin embargo, el consumo de este se ha restringido dado que el periodo de almacenamiento es corto a causa del deterioro por reacciones bioquímicas de oscurecimiento enzimático que sufre. Por consiguiente, se tiene que consumir en fresco al instante de su exposición al ambiente y su comercialización como procesado es baja. Este problema de rápido oscurecimiento enzimático es también frecuentemente causado por daños mecánicos durante el almacenamiento o post cosecha de otras frutas y hortalizas (Vámos – Vigyázó, 1981; McEvily et al., 1992). En el caso de aguacate el proceso de escaldado que se utiliza para inhibir este proceso, en tratamientos no es apropiado por el deterioro de sus nutrientes y por causar cambios de sus

atributos sensoriales, que incluyen las cuatro características básicas: textura, color; olor, sabor Nilo (1977).

El control de reacciones de pardeamiento enzimático durante el procesado y almacenamiento es muy importante para conservar la calidad visual de las frutas procesadas.

Los cambios bioquímicos involucrados en la maduración se encuentran asociados a la actividad de algunas enzimas como lo son polifenoloxidasas, pectinesterasa, poligalacturonasa y peroxidasa Nilo (1977).

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 estas enzimas 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.

2.10 Tipos de oscurecimiento en alimentos

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

- Pardeamiento no enzimático
- Pardeamiento enzimático

2.10.1 Pardeamiento no enzimático de alimentos

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

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

2.10.2 Pardeamiento enzimático de alimentos

Se denomina pardeamiento enzimático la transformación mediada por enzimas, de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, frec. entemente pardos o negros.

El pardeamiento se observa en los vegetales ricos en compuestos fenólicos. El pardeamiento enzimático no ocurre en los alimentos de origen animal, sin embargo plantea importantes problemas de coloraciones con algunas frutas y legumbres en particular cuando se alteran los tejidos de estos vegetales o se dañan por golpes durante los procesos de pelado, corte y triturado en la preparación de diversos productos derivados de éstos como pueden ser jugos, productos congelados, deshidratación, entre muchos otros Matheis (1987).

2.11 Oscurecimiento del aguacate

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

La prevención de oscurecimiento enzimático o no enzimático de los alimentos ha sido por largo tiempo una preocupación de los científicos en el área alimenticia (Matheis, 1987).

El oscurecimiento es medida por la acción de una enzima (o múltiples enzimas) que oxidan al catecol a orto – quinonas, (figura 3).

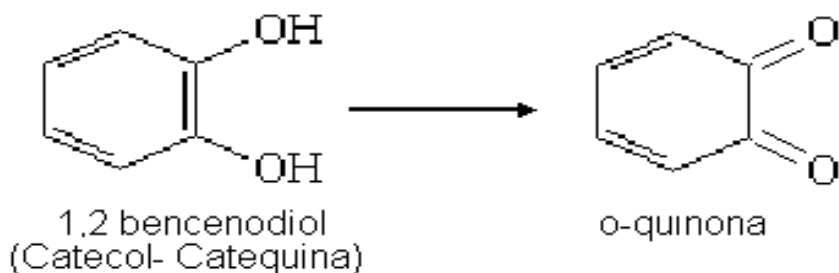


Figura 3. Oxidación del catecol.

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 según ((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 susceptible daño de la fruta de aguacate y la actividad de la enzima presente (Kahn, 1975).

2.12 Funciones de los Polifenoles en los Vegetales

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

2.12.1 El polifenoloxidasas

Las enzimas polifenoloxidasas (PPO), que son codificadas por genes nucleares (Lax et al. 1984), se localizan en el plastidio, donde están asociadas con las membranas de los tilacoides internos (Vaughn et al. 1988) y permanecen separadas físicamente de los sustratos fenólicos que se encuentran en la vacúola (Robinson & Dry 1992).

La polifenoloxidasas (PPO) 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.

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

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

La polifenol oxidasa (E.C.1.10.1.1), es una oxidoreductasa que contiene cobre como grupo prostético y a diferencia de la mayoría de las enzimas, en presencia de oxígeno, puede catalizar dos tipos de reacciones diferentes según (Whitaker, 1972). Como se muestra en la figura 4, la enzima funciona como una monooxigenasa, en la o-hidroxilación de los monofenoles a o- difenoles, y como oxidasa en la oxidación de los o-difenoles a o- quinonas (1,2-benzenodiona). Los cuales en un giro son polimerizados a pigmentos oscuros, rojos o negros (Masón, 1955; Prota, 1988; Golan – Goldhirsh et al., 1984; McEvily et al., 1992).

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

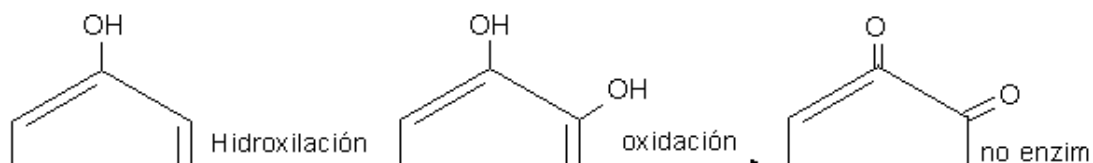


Figura. 4. Proceso de hidroxilación y oxidación de la PPO

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, ellas sí, el color café de las frutas. Esta última reacción de oxidación es rápida y no es enzimática Dorminic, (1989).

La polifenoloxidasas (PPO) puede oxidar una gran variedad de sustratos fenólicos para producir quinonas.

2.12.2 Características de la enzima PPO

La polifenol oxidasa tiene una especificidad de sustrato poco estricta, si 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.

2.12.3 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, por 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 figura 5 por lo que las sustancias (RH_2) que no son directamente oxidadas por la enzima, lo son indirectamente, vía reacciones acopladas con la o-quinona.

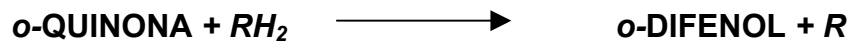


Figura 5. Proceso de reducción de o-quinonas.

De acuerdo con Bouchilloux (1962), Adams y Blundstone (1971) y Eskin (1971), la principal enzima responsable de las reacciones de oscurecimiento es la polifenoloxidasas, comprobándose también participación de otras enzimas como la peroxidasa.

Paschoalino (1978), consideró a la PPO como la principal responsable del pardeamiento en palmito, a la misma conclusión llegaron otras investigaciones para manzana.

La enzima fenolasa es la responsable del color café que aparece sobre las superficies cortadas de ciertas frutas. "Fenolasa" es un término genérico, que se emplea para nombrar a las enzimas que catalizan la oxidación de sustancias mono y ortodifenólicas.

De acuerdo con Whitaker, (1972) 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.

La inactivación de la polifenoloxidasa es muy difícil debido a su elevada actividad y resistencia a los tratamientos. En un estudio diseñado para comparar PPO proveniente de 5 frutas diferentes, llevando a cabo los mismos métodos de extracción y caracterización, se encontró que la actividad de la PPO del aguacate fue 30 veces más alta que la enzima proveniente de otra fruta (Weemaes, Ludikhuyze, Van den Broeck, Hendrickx, y Tobback, 1998). La PPO de aguacate en estudios *in vitro* fue una de las más difíciles de suprimir al comparar con las enzimas de otras fuentes vegetales y de hongos analizadas por Almeida y Nogueira (1995), usando 10 tratamientos de inactivación.

2.12.4 Mecanismo de oxidación

Estudios realizados con la cinética enzimática indican que el mecanismo de oxidación medida por la polifenoloxidasas (PPO) dependen principalmente de tres factores: contenido de oxígeno, tipo de sustrato y condiciones óptimas de actividad de la enzima (pH, temperatura, presencia de inhibidores, concentración sustrato, etc.). El pH óptimo oscila entre 6 y 6.5 en presencia de un sustrato rico en compuestos fenólicos, como por ejemplo: los pigmentos antocianínicos, catequinas, proantocianidinas, flavonoles y flavonas, grupo más reactivo.

2.12.5 Importancia de la Polifenoloxidasas (PPO)

Además de la gran importancia en la determinación de los atributos de calidad de frutas y hortalizas ya 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 PPO juega papel importante en metabolismos vegetal 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).

Además, se reporta que en vertebrados la enzima es de importancia central en pigmentación. Es responsable directamente de la conversión de aminoácido tirosina a pigmento melanonina, Robb (1984), que protege la piel de radiación UV.

2.12.6 Formas para inhibir la acción de la PPO

La enzima puede desnaturalizarse por medio del calor. En productos como las verduras que se cocinarán, la solución de oscurecimiento es obvia. Sin embargo, en las frutas que se comerán crudas deberán buscarse agentes inhibidores. El ácido ascórbico es un efectivo agente reductor de las o-quinonas formadas por la fenolasa, pero como no inhiben la acción de ésta debe ponerse una cantidad excedente (Figura 5).

La inhibición de la actividad de la enzima polifenoloxidasasa puede conseguirse mediante varios métodos, entre los que se destacan son: la adición de agentes antioxidantes, ajuste del pH, almacenamiento en atmósfera pobres en oxígeno y tratamientos térmicos. 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.

Varias propuestas para obtener productos de aguacate han fallado debido al proceso de oscurecimiento (Gerdes y Parrino- Lowe, 1995). Ninguna de ellas estuvo basada en la caracterización de la PPO, ni en un diseño para llevar a cabo su inhibición. Fue posible obtener un puré de aguacate estable hecho por medio de un tratamiento de altas presiones adicionando NaCl y acidificación (López-Malo, Palou, Barbosa-Cánovas, Welti-Chanes, y Swanson, 1999). De cualquier manera, esa tecnología es muy cara y suele utilizarse en países muy desarrollados.

En los trabajos previos, se menciona que el tratamiento térmico es generalmente considerado como el método mas efectivo en la inactivación de la polifenoloxidasa y consecuentemente en la inhibición del oscurecimiento enzimático (Golan – Goldhirsh et al., 1984; McEvily et al., 1992).

2.12.7 Investigaciones acerca del Estudio de la Polifenoloxidasa

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

La polifenol oxidasa 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).

La mayoría de los métodos descritos han sido enfocados a la determinación de la actividad difenolasa de esta enzima. Para la mayoría de las fuentes de enzima incluyendo polifenoloxidasa de aguacate, la actividad difenolasa a sido caracterizada extensamente, (Benjamín y Montgomery, 1973; Khan, 1976 a, b; Halim y Montgomery, 1978, Lelyveld et al., 1984; Janovitz – Klapp et al., 1990; Heimdal et., al., 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 fue posible encontrar uno en donde es estudiada la actividad monofenolasa de la polifenoloxidasasa del aguacate (Khan y Pomerantz, 1980).

Esta escasa información acerca de la actividad monofenolasa de polifenoloxidasasa 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 PPOs (Mayer y Harel, 1979) y esta relacionada con los cambios en la estructura de la proteína durante su purificación (Walter y Purcell, 1980).

Se han realizado una gran variedad de trabajos sobre la polifenoloxidasasa principalmente en frutos, en comparación a trabajos realizados en hortalizas y en órganos subterráneos reservantes. La enzima ha sido estudiada en frutos tales como aguacate (Khan, 1985; Laderoza *et al.*, 1980 y Khan, 1977), cambur (Palmer, 1963 y Rivas, 1978), durazno (Paulson y Vanderstoep, 1980 y Wong *et al.*, 1972), pera (Rivas y Whitaker, 1973 y Wisseman y Montgomery, 1985), mango (Thomas y Janave, 1973), también en espinaca (Sato, 1982), batata (Tanaka y Uritani, 1977) y ñame (Adamson y Abigor, 1980).

Los estudios previos demostraron que el problema de la búsqueda de los inhibidores no tóxicos de las enzimas, es uno de los mas importantes en la actualidad. Todo lo anteriormente presentado motivó por el cual el siguiente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

3.1 Etapas del trabajo de investigación

Como se mencionó anteriormente el propósito de este trabajo es la obtención y evaluación de la capacidad inhibitoria del proceso de oscurecimiento de los compuestos extraídos a partir de la semilla de aguacate (*Hass Persea americana* variedad *mill*).

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en varias etapas:

1. Extracción de la PPO a partir de pulpa de aguacate
2. Extracción de los compuestos a probar con capacidad inhibitoria de la semilla del aguacate
3. Determinación de las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la reacción (temperatura y concentración de enzima inicial), por medio de seguimiento al espectrofotómetro
4. Seguimiento y evaluación del grado de inhibición por adición al sistema de inhibidores químicos comúnmente empleados (ácido ascórbico, ácido cítrico y m-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

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición y Alimentos 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° 23', una longitud Oeste de 101° 02' y una altura de 1743 m.s.n.m.

3.3 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio

Los materiales empleados para esta investigación (cuadro 2) fueron los siguientes:

Cuadro. 2. Material utilizado en el laboratorio.

Cuchillos	Gradillas
Tabla	Vaso de precipitado
Espátulas	Micropipetas
Micropipetas	Matraces de aforación (500 ml, 1000 ml, 50 ml, 100 ml).
Embudo	Matraces Erlenmeyer 500 ml.
Probetas	Pipetas
Termómetro	Pisetas
Tubos de plástico para centrifuga	Papel Whatman No.1 y No.5

Tubos de ensaye	
------------------------	--

Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados en la presente investigación se en lista en la siguiente (cuadro 3.)

Cuadro. 3. Equipos de laboratorio utilizados.

Equipo	Marca
Congelador	American
Licuadaora	Philips
Centrifuga	
Bomba de vacio	Duo seal* Vacuum pump
Refrigerador	Hotpoint
Potenciómetro	Corning
Parrilla Magnética	Corning
Agitador magnético	Termolyne
Balanza granataria	Sauter
Balanza analítica	A&D
Vortex	Genie mixer
Espectrofotómetro	Genesy TM

Reactivos

Buffer fosfato 0.1 M, Ph 6.8 , NaOH 0.313 N, HCl 0.1 N, acetona, colorante azul brillante de coomasie, agua destilada, catecol, albúmina, ácido ascórbico, ácido cítrico, m-bisulfito de sodio, etanol, ácido fosfórico.

3.4 Material Vegetal

Los aguacates fueron comprados en el supermercado de la ciudad de Saltillo. Se adquirieron aproximadamente 5 kg en estado de madures, cantidad necesaria para realizar el experimento que posteriormente fueron llevados al Laboratorio de Nutrición y Alimentos de la División de Ciencia Animal de la UAAAN, donde fueron congelados a temperatura de 15°C, por 24 horas.

3.5 Extracciones

3.5.1 Extracción de Enzima

El material congelado 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 la pulpa se homogenizó en una licuadora utilizando como medio de extracción buffer fosfato 0.1 M, pH 6.8 (por cada 50 gr de muestra se adiciono 100 ml de buffer), la mezcla se pasó a centrifugación a 3000 rpm durante 45 minutos a temperaturas bajas obtenidas por adición de camas de hielo (se recomiendan Guadarrama y Nilo Rivas (1990) velocidades de 36.717 urante 30 minutos 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

sometió a un filtrado, donde fue descartado el precipitado dejando el sobrenadante, el cual representa al extracto crudo que contiene la enzima.

Al extracto crudo se le agregó un doble volumen de acetona fría (-15 °C), posteriormente la mezcla se pasó a una segunda centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos (se recomiendan velocidades de 653 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) y el precipitado obtenido que contiene la enzima fue resuspendido en una cantidad de 20 ml de buffer fosfato 0.1 M a un pH 6.8.

3.5.2 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 (3.5.1), la diferencia fue de en esta se utilizo la semilla completa con la cáscara que la protege para la extracción de los compuestos con capacidad inhibitoria.

También para el otro extracto fue usada solamente la pulpa del hueso sin la cáscara, y se uso el mismo método que para la extracción de la PPO (3.5.1)

3.6 Ensayo de Determinación de la Actividad Enzimática

Fue utilizado el método espectrofotométrico de Pontingy Joslyn (1948), aplicando catecol como sustrato.

La mezcla de reacción contenía sustrato catecol 0.01 M, buffer fosfato 0.1M, pH 6.8 y el extracto enzimático, cuyo contenido fue variado.

Se midió el cambio en absorbancia a 420 nm en función al tiempo, originado al mezclar el sustrato con la enzima que fue registrado en un espectrofotómetro (Genesy™).

La actividad enzimática se calculo a partir de las pendientes iniciales de las curvas cinéticas obtenidas, es decir midiendo la tasa inicial de formación de quinonas, indicada por un incremento de absorbancia a 420 nm.

3.6.1 Determinación del Contenido de Proteína

Este ensayo se realizo mediante el método de Bradford, utilizando albúmina de suero de bovino como estándar para la elaboración de la curva patrón, obtenida con el reactivo de azul brillante de coomasie. Para esta determinación se utilizó la mezcla de 1 ml de agua destilada y solución de coomasie.

Tanto en la curva de calibración como en evaluación de concentración de proteína en muestra problema se tomó un 1ml de la solución que contenía proteína y 1ml de reactivo de coomasie. La mezcla se homogenizó con ayuda del vortex, se tomo el tiempo en que el coomasie reacciona con la proteína, dejando reposar la mezcla por 3 minutos. Después de transcurrido este tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 595nm.

3.7 Caracterización de las condiciones óptimas para la actividad enzimática.

3.7.1 Estudio de la variación de la actividad enzimática en función de concentración de enzima.

Este ensayo se realizó mediante la técnica descrita anteriormente (3.6) para los ensayos de determinación de la actividad, variando la concentración de enzima en la mezcla de reacción mediante aplicación de diferentes volúmenes de extracto en un rango 10 a 100 μ l.

3.7.2 Efecto de la temperatura

La temperatura óptima se determinó realizando la reacción en un rango estudiada fue entre 15 y 80 °C, el monitoreo de la actividad se efectuó mediante la técnica anteriormente descrita (ver subcapítulo 3.6.)

3.8 Efecto de los inhibidores

Se estudió la inhibición de la enzima por los extractos obtenidos del hueso que fueron usados como inhibidores de origen natural (huecas, hueso). El efecto inhibitorio fue comparado con el observado en presencia de los inhibidores químicos: el ácido ascórbico, meta bisulfito de sodio y un sinergismo entre ácido ascórbico y cítrico (50:50). Las concentraciones aplicadas fueron de 200, 400, 600 y 900 μ M. Para los 3 aditivos químicos. En todos los casos el sustrato fue catecol 0.01M y se utilizó el buffer fosfato 0.1M, pH 6.8 como medio para llevar a cabo la reacción. Se determinó la actividad a partir de las pendientes iniciales de las curvas cinéticas graficadas, es decir se evaluó y comparó la tasa inicial de formación de quinonas, indicada por un incremento de absorbancia a 420 nm dividiendo la diferencia entre la actividad presentada en los sistemas libres de

sustancias inhibitorias, y este valor sobre la actividad obteniendo así los porcentajes de inhibición.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la presente investigación enfocados a la búsqueda de inhibidores naturales del proceso enzimático de aguacate Hass *Persea americana* variedad *mill*.

4.1 Obtención de extractos a partir de pulpa y hueso de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*).

Durante la realización del presente trabajo se obtuvieron extractos proteicos a partir de la pulpa de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*), y de la semilla del fruto en este caso se usaron: a) pulpa de semilla y b) semilla completa. Este se realizo mediante el cambio de actividad acuosa por medio de adición de acetona. En los extractos obtenidos se evaluó la actividad enzimática expresada en cambios de absorbancia por minuto detectada a 420 nm/min (Δ Abs/min) y concentración de proteínas, estas unidades corresponden a las reportadas por Angel Guadarrama y Nilo Rivas en (1990), que proponen este método de evaluación de la enzima de interés.

En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de los extractos en cuestión. Los datos presentados corresponden al valor de la actividad especifica del extracto, es decir la actividad correspondiente a 1 mg de proteína del preparado.

Cuadro 4. Resultados de caracterización de los extractos.

Muestra	Actividad, Δ Abs/min	Conc. proteína mg/ml	Volumen ml	Actividad esp. ΔAbs/min*mg
Extracto de pulpa de aguacate	0.5430	1.03	2.0	10.54
Extracto de semilla completa	0	0.38	2.0	0
Extracto de pulpa de semilla.	0	0.21	2.0	0

4.2 Estudio de la variación de la actividad enzimática en función a la concentración de enzima.

En el presente ensayo se realizaron diferentes cinéticas de reacción variando el volumen de enzima añadiendo en la mezcla de reacción desde 30 hasta 100 μ l. La actividad fue a partir de las pendientes iniciales de las curvas cinéticas como la medida 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 μ l, catecol 0.01M).

Como se puede observar en la figura 6 y el cuadro 5, a medida que la concentración de enzima se incrementa, también la actividad detectada se ve incrementada hasta alcanzar un máximo en la concentración de 60 μ l, que permanece sin cambio cuando se utilizaron mayores volúmenes del extracto (figura 6).

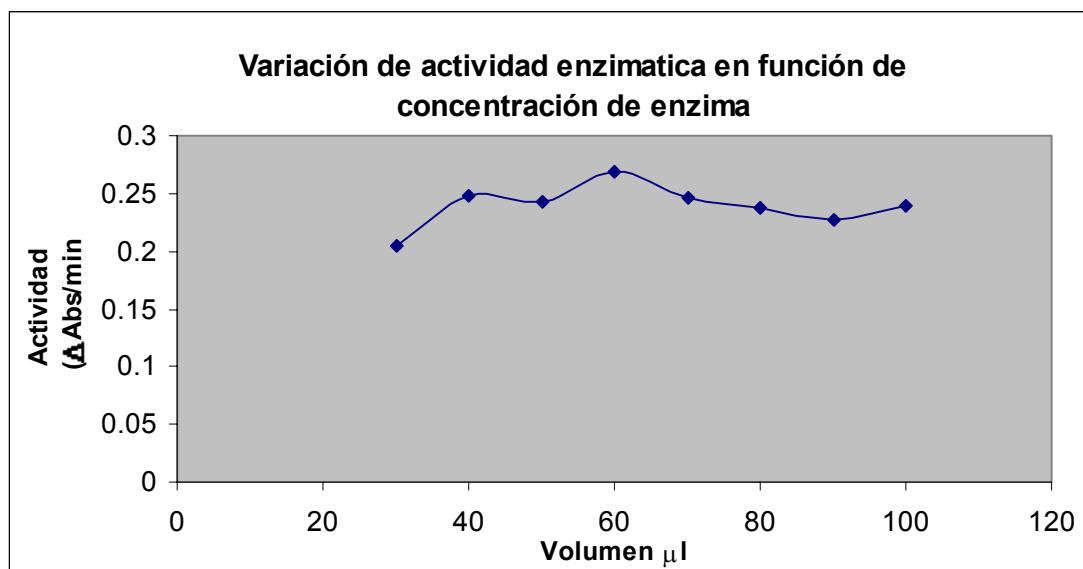


Figura 6 Representación de la concentración en cuanto actividad total.

Cuadro 5. Estudio de la velocidad de reacción en función a la concentración de enzima.

Volumen añadido de E. $\mu\text{lt.}$	Conc. Relativa de enzima	Conc. Proteína mezcla de rxn mg.	Act.tot. $\Delta \text{A}420\text{nm}/\text{min}$
30	E_0	0.031	0.2045
40	$1.3 E_0$	0.041	0.2475
50	$1.7 E_0$	0.051	0.2435
60	$2.0 E_0$	0.061	0.268
70	$2.3 E_0$	0.071	0.246
80	$2.7 E_0$	0.081	0.237
90	$3.0 E_0$	0.091	0.228
100	$3.3 E_0$	0.101	0.2395

Los resultados de este ensayo son de gran relevancia para el desarrollo del presente trabajo ya que se demuestra y comprueba que el proceso estudiado es de tipo enzimático observo que la velocidad de reacción depende de la concentración de enzima (cuadro 5) y la dependencia se describe como una función hiperbólica.

Este comportamiento es tipo para las enzimas michalianas en condiciones cuando la concentración de enzima es mucho mayor que la concentración de sustrato.

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

Según los datos reportados (Klyerer A.A. , Beresin I. V.1979 curso practico de cinética química y enzimática, Nauta, Moscu, Rucia pag. 116 – 12.), si $E_0 > S_0$ la velocidad de reacción $V_0 = \frac{K_{cat} S_0 E_0}{K_m + E_0}$. El comportamiento de la figura 6 corresponde a esta ecuación. El estudio cinético comprueba que el proceso es un proceso enzimático que se realiza en condiciones cuando concentración de enzima es mayor que de sustrato.

Considerando la curva presentada en la figura 6, en los siguientes experimentos se decidió utilizar la concentración de enzima correspondiente a 60 μ l adicionados de extracto para estas condiciones, la velocidad de reacción no varia significativamente al disminuirse o aumentarse la concentración de enzima de un (10 -15 %). Esto significa que si en diferentes extracciones la concentración de enzima puede ser variada dentro de este rango.

Por otro lado es mas fácil controlar la concentración inicial de sustrato que de enzima inicial es la razon por la cual se escogieron las condiciones de ($E_0 \gg S_0$).

4.3 Efecto de la temperatura

Determinación de la temperatura óptima

Los incrementos de temperatura aceleran la velocidad de las reacciones químicas. En los sistemas mediados por enzimas este fenómeno se presenta de igual manera, solo que al ser éstas de naturaleza proteíca, las enzimas enfrentan también el proceso de desnaturalización.

La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de ésta , 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.

En el presente trabajo se observó que la temperatura óptima, a la cual la actividad de la enzima polifenoloxidasas de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) es máxima, osciló alrededor de los 30°C, los resultados de este ensayo como pueden observarse en la figura 7 y en el cuadro 6 .

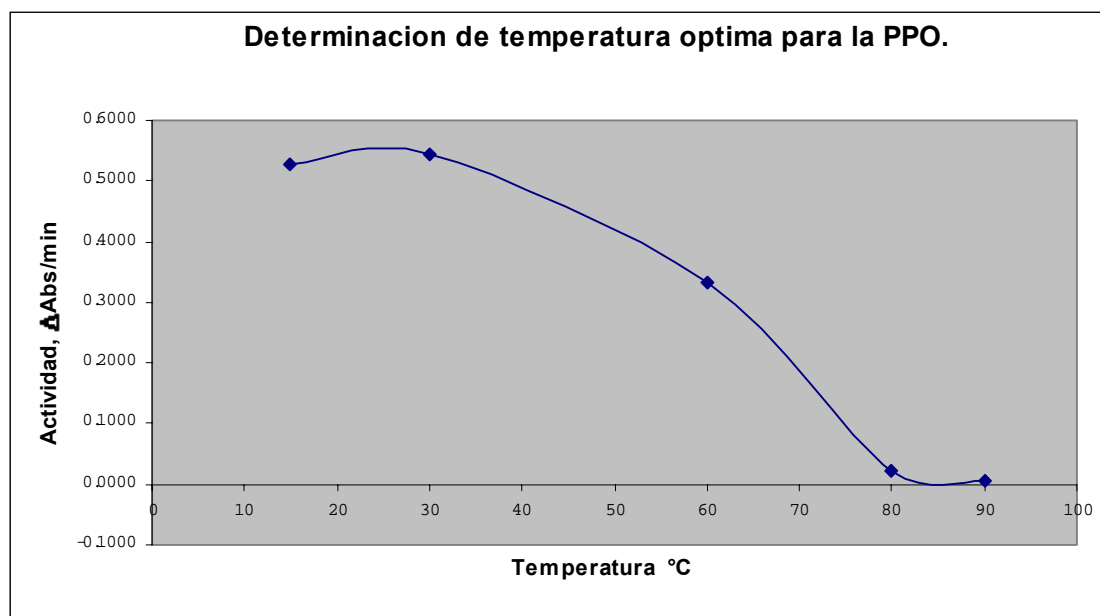


Figura 7. Representación de actividad de la PPO extraída del aguacate en función a la temperatura.

Cuadro 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PPO del aguacate Hass *Persea americana* variedad *mill*

Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Actividad $\frac{\Delta\text{A}420\text{nm}}{\text{min.}}$
15	0.5270
30	0.5430
60	0.3330
80	0.0230
90	0.0050

La temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ detectada como óptima para la PPO de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*), es similar a la temperatura óptima reportada para las enzimas 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 reporta que la temperatura óptima en la cual se observó la mayor actividad esta dentro del rango de 35 a 45 °C, detectando una disminución a los 60°C, como consecuencia del inicio de la desnaturalización de la enzima.

La temperatura de los 30 °C se aplico en los ensayos posteriores para medición de la actividad de la PPO.

4.4 Estudios del proceso inhibitorio

4.4.1 Proceso de inhibición con aditivos químicos.

Los antioxidantes químicos mas utilizados en la industria son: el ácido ascórbico, el m-bisulfito y la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico (50-50). El uso de estos compuestos químicos permite reducir el oscurecimiento enzimático de las frutas y hortalizas durante su industrialización Rivas (1997).

En estudio realizado con la PPO de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) en el presente trabajo se observo que los inhibidores químicos anteriormente mencionados además de causar una disminución en la actividad de la enzima también provocan un retardo en el inicio de esta reacción. (Figura 8 y cuadro 7)

Cuadro 7. Efecto de diferentes inhibidores químicos a concentraciones variables, sobre la actividad de la PPO del aguacate Hass (*persea american* variedad *mill*).

Inhibidor	Concentración en la mezcla de reacción.	% Inhibición
m-bisulfito	200 µM	25.4

	400 μ M	44.0
	600 μ M	52.3
	900 μ M	63.7
Ácido Ascórbico	200 μ M	31.2
	400 μ M	50.4
	600 μ M	70.7
	900 μ M	77.5
Mezcla Cinergista (50:50)	200 μ M	41.3
	400 μ M	55.4
	600 μ M	77.9
	900 μ M	82.7

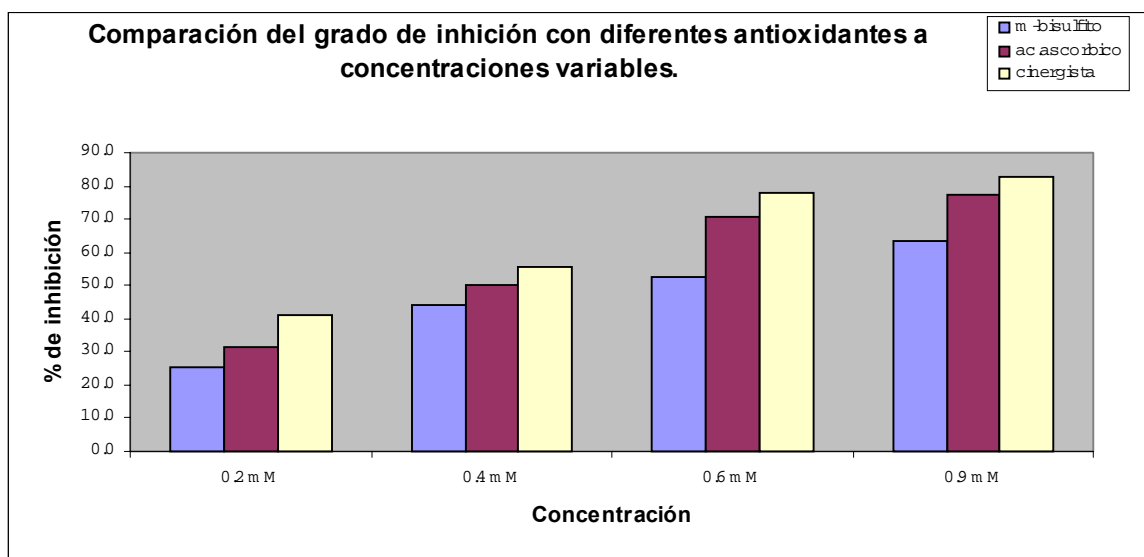


Figura 8. Comparación de efecto inhibitorio de 1-m-bisulfito, 2- ácido ascórbico, 3- mezcla de ácido ascórbico y cítrico aplicable

La presencia del periodo lag en las curvas cinéticas demuestra que en presencia de estos compuestos se altera el mecanismo de formación de las quinonas detectadas en el ensayo realizado.

La alteración puede estar relacionada con la reacción descrita en la figura 5 (capítulo 2). Es decir los inhibiciones químicas activan los procesos de reducción que no permite la acumulación en el medio de reacción del producto detectado.

Además su acción puede estar relacionada con eliminación del oxígeno (otro sustrato de la PPO, ver figura 4) del medio de la reacción que por un lado debe reflejarse en actividad de la enzima y por otro lado puede provocar la aparición del periodo lag.

Es probable también que algunos de estos inhibidores, por ejemplo ácido cítrico, actúan como quelantes que remueven el ion de Cu (cofactor de enzima), cambiando la conformación activa de PPO.

Los resultados del cuadro 7 y figura 8 demuestran que el grado de inhibición de la PPO de aguacate Hass (*Persea americana* variedad mill), responsable del proceso de oscurecimiento enzimático de tanto 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 la inhibición fue la mezcla de ácido ascórbico-cítrico (50:50) la cual presentó mayor inhibición 82.7% al ser adicionada en una concentración de 900 μM . En la presencia de la misma concentración del ácido ascórbico se obtuvo un 77.5% de inhibición y finalmente con el m-bisulfito de sodio se detectó solo un 63.7%. Los resultados obtenidos en presente ensayo concuerdan con los obtenidos por Nilo Rivas R. en 1977 con PPO extraída a partir de cambur de manzano.

Según el reporte mencionado estas sustancias son fuertes inhibidores de la enzima en cuestión, más, sin embargo, confieren al producto fresco sus sabores característicos teniendo con ello una desventaja desde el punto de vista

organoléptico, sin mencionar las posibles alteraciones en el valor nutricional del producto caracterizadas en este trabajo en la sección introductoria.

Los resultados de inhibición demuestran nuevamente que el proceso estudiado en el presente trabajo es mediado por la enzima conocida como PPO y no de otros catalizadores (peroxidasa, esterasas, etc.) que no demuestra actividad en las condiciones de reacciones aplicadas y no son inhibidas por las sustancias probadas en el presente ensayo.

Después de demostrar que la actividad del preparado enzimático obtenido a partir de pulpa de aguacate Hass *Persea americana* variedad *mill* es inhibida con los compuestos químicos conocidos como inhibidores de PPO, se procedió a realizar el estudio de evaluación de la actividad de enzima de interés en presencia de los extractos obtenidos a partir de semilla o pulpa de la semilla del fruto de aguacate de la misma especie

Las características de los preparados extraídos (en tanto a la concentración de proteína y actividad de PPO) se presentaron en el cuadro 4. Como la concentración inicial de el (los) inhibidor (es) en el extracto es desconocida, el estudio se realizó aplicando diferentes volúmenes de muestras en cuestión, considerando que esto permite variar su concentración mientras el volumen final de la mezcla de variación permanece constante. Los resultados obtenidos en el presente ensayo se demuestran en el cuadro 8 y figura 9.

4.4.2 Inhibición de PPO mediante adición de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate Hass *persea americana* variedad *mill*

Cuadro 8. Efecto de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate y de pulpa de semilla de aguacate sobre la actividad de la PPO del aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*).

Volumen μl añadido en la mezcla de reacción.	Concentración relativa	% de inhibición con extracto de semilla completa	% de inhibición con extracto de pulpa de semillas
10	1 I_0	78.56	75.53
20	2 I_0	78.82	83.88
30	3 I_0	80.46	83.42
40	4 I_0	81.86	83.52
50	5 I_0	81.97	84.99
60	6 I_0	83.51	86.27
70	7 I_0	85.50	86.39
80	8 I_0	89.77	86.42
90	9 I_0	94.34	88.08
100	10 I_0	94.52	95.28

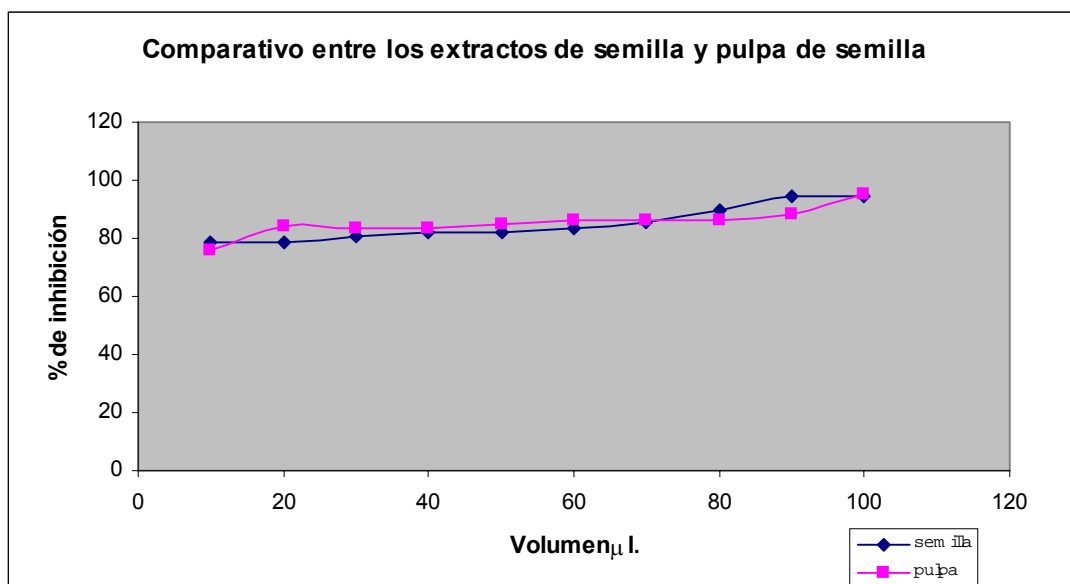


Figura 9. Comparación de extracto de semilla (■) y extracto de pulpa de semilla (▲) sobre la actividad de PPO aguacate Hass 8 (*Persea americana*) variedad mill.

En el cuadro 8 se observa como el grado de inhibición de PPO, enzima responsable de oscurecimiento enzimático en el fruto de aguacate Hass (*Persea americana* variedad mill), es incrementado a medida que la concentración del extracto inhibitorio es aumentado. Sin embargo, en el rango de concentraciones aplicadas, no se observa un efecto tan marcado en función de incrementos de la concentración del extracto como sucede con los aditivos químicos.

Esto puede ser relacionado con que bajo variaciones iniciales del volumen, el sistema se encuentra en estado cercano a la saturación con el (los) inhibidor (es) provenientes de semilla y pulpa de semilla de aguacate.

También es probable que el mecanismo de inhibición en este caso es distinto a lo propuesto para los compuestos químicos. A esto indican las diferencias en comportamiento de la cinética de la reacción de oxidación de catecol catalizada por PPO de aguacate Hass. En este caso no se observó la

presencia del periodo lag en las curvas cinéticas, si no disminución de la pendiente en presencia de extractos en cuestión.

Con respecto a la naturaleza de los inhibidores de la semilla se puede probar que estos tienen carácter proteico, ya para su extracción se utilizaron los métodos aplicados en manejo de proteínas. Además los resultados del cuadro 4 muestra la presencia de compuestos de este tipo.

Los resultados demuestran (figura 8) que la inhibición por medio de los extractos obtenidos a partir de semilla y de pulpa de semilla de aguacate hass (*Persea americana* variedad *mill*), no variaba mucho entre si en función de la concentración del inhibidor. Las diferencias en por ciento de inhibición en ambos casos no son estadísticamente significativas ,por ejemplo el 95.28% de de pulpa de semilla, contra el 94.52 de la semilla completa cuando se adicionó el volumen de 100 μ l.

Esto permite suponer que la fracción realmente responsable del proceso inhibitorio es la pulpa de semilla ya que es el componente mayoritario en los dos extractos probados.

Comparando el grado de inhibición presentado con los inhibidores químicos es posible visualizar diferencias marcadas. En este caso el compuesto que presentó mejores resultados (mezcla de ácido ascórbico y cítrico) logró solo un 82.7% de inhibición. Este grado de inhibición fue alcanzado en las concentraciones iniciales de la adición de los extractos obtenidos a partir de pulpa de semilla y de semilla completa (83.88% en presencia de 20 μ l y 81.97% en presencia de 50 μ l, respectivamente). Es decir la inhibición con los aditivos químicos aplicados a concentración de 0.9 mM mostró los valores por debajo del

95.28 y 94.52% obtenidos con los extractos de pulpa y semilla completa, respectivamente, en el estudio realizado en esta etapa del trabajo.

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

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

Cabe mencionar, sin embargo, que los resultados obtenidos con el aguacate Hass concuerdan con los arrojados en el estudio realizado en el laboratorio de Nutrición y Alimentos de la UAAAN, con otro de otra especie (criollo *persea nubigena* L.Wms variedad nubigena, Hernández – Maro (2003)

A pesar de que al igual como con el aguacate Hass, los extractos obtenidos de semilla de aguacate criollo mostraron el efecto inhibitorio sobre la PPO de este tipo de fruto, los porcentajes de inhibición detectados en presencia de diferentes volúmenes de extractos (aplicados al mismo ensayo) fueron menores a los detectados en el presente trabajo.

El grado de inhibición máximo logrado en este sistema fue de 83.9% alcanzado con la adición 90 μ l de extracto de semilla completa es decir similar al obtenido con la mezcla ácido ascórbico-cítrico (83.88%) aplicada en el sistema con aguacate hass(*persea americana* variedad *mill*),, en el presente estudio.

En el caso del aguacate criollo al igual como en este estudio se observaron los mismos niveles de inhibición en presencia de extractos de pulpa de semilla y de semilla completa(Hernández-Maró).

La comparación de los resultados obtenidos en ambos estudios demuestran que la semilla de aguacate contiene los compuestos que inhiben la actividad de PPO, responsable del oscurecimiento enzimático del fruto. Por otro lado, la presencia de mayor efecto en el caso de aguacate Hass puede servir para explicar el porque esta especie gana actualmente el mercado mexicano y en parte mercado mundial, en comparación con el aguacate criollo. Como se menciona en revisión de literatura, los frutos de aguacate Hass son mas resistentes al tiempo de conservación, o daños mecánicos.

Los resultados obtenidos en estudios realizados en este laboratorio permiten suponer que esto se debe a mayor protección del fruto por parte de compuestos que inhiben el oscurecimiento y que están presentes en la semilla del aguacate Hass en mayor cantidad o con mayor capacidad.

4.5 Aplicación en fresco de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate hass (*persea americana* variedad *mill*)

El cuadro No. 8, presenta los resultados de una prueba realizada a la pulpa de el aguacate en fresco, para ello se aplicaron los extractos inhibitorios que fueron extraídos de la semilla, para llevar a cabo observación visual para determinar el tiempo, en el cual el producto empieza a presentar oscurecimiento , teniendo como control pulpa sin adición de los extractos.

Además de ensayos enzimáticos, se realizaron ensayos en fresco que permiten observar el efecto de la adición de los extractos de semilla y su fracción (pulpa) sobre el proceso de oscurecimiento de aguacate preparado por la técnica casera. En ambos casos, como se observa en el cuadro 9 fue posible apreciar que

en comparación con el control (sin adición de extractos) el tiempo de aparición de oscurecimiento se incremento a 6 horas.

Cuadro 9. Efecto de los extractos aplicados a pulpa de aguacate Hass (*Persea americana* variedad *mill*) en fresco.

Fracción aplicada en pulpa de aguacate	Tiempo hasta observación de oscurecimiento, min.
Control	15-20 min.
Precipitado con acetona obtenido de semilla completa huecas.	6 horas
Precipitado con acetona obtenido de pulpa de semilla sin cáscara.	6 horas

Por lo tanto, este trabajo abre nuevas perspectivas en la búsqueda de los conservadores naturales que permitirían en un futuro próximo el desarrollo de nuevas tecnologías para la obtención de productos procesados a partir de aguacate.

Capitulo 5

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

A partir de pulpa de aguacate se logró obtener un extracto con actividad de PPO.

En el estudio de las cinéticas de reacción de oxidación de catecol en presencia de diferentes concentraciones de extracto de pulpa de aguacate hass se observó el comportamiento que comprueba que el proceso estudiado es mediado por presencia de la enzima PPO.

Se demostró que la temperatura óptima para la reacción catalizada por PPO de pulpa de aguacate Hass oscila alrededor de los 30 °C. A temperaturas superiores a la anteriormente mencionada se observó decremento en la actividad, conservando 4.23% 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 Hass responsable del proceso de oscurecimiento enzimático es inhibida con compuestos químicos tales como el ácido ascórbico, m-bisulfito de sodio y la mezcla ácido cítrico-ascórbico (50-50).

El mayor porcentaje de inhibición se observó en presencia de 900 μ M de la mezcla de ácido cítrico y ascórbico (50-50) alcanzando un grado del 83.9%. A la

misma concentración el ascórbico, y el m-bisulfito de sodio presentaron un 77.5% y un 63.7% de inhibición de la actividad, respectivamente.

Se observó que en presencia de inhibidores químicos la cinética del proceso en cuestión presenta un periodo lag.

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 Hass.

Se observó que los extractos de pulpa de semilla y de semilla completa de aguacate Hass provocan un efecto inhibitorio sobre PPO de aguacate Hass, 95.28 y 94.52% respectivamente, dichos valores son mayor que los observados en presencia de los compuestos químicos anteriormente mencionados a 0.9mM.

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 obscurecimiento por un periodo de 6 horas que es 18 veces mayor que en el control sin adición de extractos.

Capitulo 5

LITERATURA CITADA

1. Adams, JB y Blundestone. 1971 Canned fruits other than citrus. In: Hulme a.c. ed. The Biochemistry of fruits and Thier Products. London, Academic Press, vol 2, p.507-541.
2. 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.
3. 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.
4. Avallone, C. M., Cravzov, A. L., Montenegro, S. B., Pellizzari, E. Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinesterasa y polifeniloxidasas en extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgaris* Schard).
5. Benjamin, N. D.; Montgomery, M. W. Polyphenol oxidase of Royal Ann cherries: purification and characterization. *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 779-806.
6. Brom, R. E. Carvalho, C. Francisco. 1966. El aguacate. Editor Juan Lozaya Dávila.
7. Brom, R. E. El aguacate. 1970. México, D. F. Enero 1970.
8. Buchilloux, S., 1962. Enzymatic browning reaction. In: Runeckles, V.C., ed. *Plants Phenolics and Their Significance*, Montreal, Imperial tobacco Co., p.1-14
9. 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.

10. Castalleda, A. B. El cultivo del Aguacate en la Región de Tlapacoyan, Veracruz. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Coahuila. Escuela Superior de Agricultura “ Antonio Narro”. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. (1971).
11. Cheftel; C.J.1976.introduccion a la tecnología de los alimentos. Edit. Acribia.vol 1.
12. 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.
13. Cordova, A. E. El Cultivo del aguacate (*Persea ssp*) y sus plagas. Monografía Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. (1986).
14. 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.
15. Cortés, R.; González, S.; Pennacchiotti, I.; Parraguirre, V. Estudio de las condiciones químicas y tecnológicas para una posible industrialización de la palta (aguacate) (Study of the chemical and technological conditions to a possible industrialization of the avocado). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* **1971**, 11, 295-300.
16. Eskin, N.A.M.; Henderson & R. J. Townsend, 1971.*Biochemistry of foods*. London, Academic Press. 239 p.

17. Espín, J. C.,(†) Trujano, M.F.,(†); Tudela,J.(†) ; García- Cánovas, F.(†). Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Haas Avocado.J. Agric. Food Chem. **1997**, 45, 1091-1096.
18. Espín, J. C.; † Morales, M.; †García- Ruiz, P. A; † Tudela, J.; † García- Cánovas, F, †. Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Mushroom Polyphenol Oxidase. J. Agric. Food Chem. **1997**, 45, 1084-1090
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García- Cánovas, F. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Blanquilla pear. *Phytochemistry* **1996b**, 44 (1), 17- 22.
23. Fersini, A. *El Cultivo del Aguacate* (Avocado production); Editorial Diana: México City, 1975.

24. George, D. R. La industria del aguacate. Boletín universidad de Florida. Primera edición 1974.
25. Gerdes, D. L., and Parrino-Lowe, V. (1995). Modified atmosphere packaging (MAP) of Fuerte avocado halves. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 28, 12–16.
26. Golan-Goldhirsh, A.; Whitaker, J. R.; Kahn, V. Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1984**, 177, 437-456.
27. Gómez, L. V. M (†). Characterization of Avocado (*Persea americana* Mill.) Varieties of Very Low Oil Content. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3643-3647.
28. Gómez, L. V. M . Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chemistry* 77 (2002) 163–169
29. Gomez, R. F.; Bates, R. P. Storage deterioration of freeze-dried avocado puree and guacamole. *J. Food Sci.* **1970**, 35, 472- 475.
30. 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.
31. Halim, D. H.; Montgomery, M. W. Polyphenol oxidase of d’Anjou pears (*Pyrus communis* L.). *J. Food Sci.* **1978**, 43, 603-608.
32. Hall, A. P.; Moore, J. G.; Morgan, A. F. B vitamin content of California-grown avocados. *J. Agric. Food Chem.* **1955**, 3, 250-252.

33. Heimdal, H.; Larsen, L. M.; Poll, L. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1428-1433.
34. Hernández, V. R. El Cultivo del Aguacate en el Estado de Morelos. Tesis Profesional. Universidad de Coahuila. Escuela Superior de Agricultura. Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. (1967).
35. Ibáñez, O. J. El Cultivo del Aguacate (*Persea americana*, Mill.) y sus Principales Variedades. Monografía Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México (1997)
36. Janovitz - Klapp, A. H.; Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1437-1441.
37. Kahn, V. (1975). Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *26*, 1319–1324.
38. Kertesz, D. and R. Zito 1957: Polyphenoloxidase purification and molecular properties. *Nature*. London, *179*:1017-1018.
39. Khan, V. (1976a). Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. *Phytochemistry*, *15*, 267–272.
40. 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.

41. Khan, V. (1977). Some biochemical properties of polyphenoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *Journal of Food Science*, 42, 38–43.
42. Khan, V. 1977. 1985. Effect of proteins, protein hidrolizate and aminoacids on o-hidroxiphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom and avocado. *J. Food. Sc.* 50:111-115.
43. Khan, V.; Pomerantz, S. H. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **1980**, 19, 379-385.
44. 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.
45. Lax A.R., K.C. Vaughn & G.E. Templeton. 1984. Nuclear inheritance of polyphenol oxidase in *Nicotiana*. *J. Hered.* 75: 285-287.
46. 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.
47. Lime, B. J. Preparation and storage studies of freeze-dried avocado salad. *Food Technol.* **1969a**, 23, 317-320.
48. Lladser, M.; Piñaga, F. Criodeshidratación de aguacates. I. Estudio sobre el comportamiento eutéctico e higroscópico del aguacate liofilizado y ensayo de almacenamiento acelerado del mismo (Eutectic and hygroscopic behavior of freeze-dried avocado and assay of its accelerated storage). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* **1975**, 15, 547-559.

49. 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.
50. Mason, H. Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* **1955**, 16, 105-184.
51. 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.
52. Mathew, A G. y H.A. Parpia. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research* 19:75-145.
53. Mayer, A. M., and Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, 193–215.
54. Mayer, A.M. Polyphenol oxidases in plants. *Recent progress phytochemistry* 1987, 26, 11-20.
55. 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.
56. 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.
57. Palmer, J.K 1963. Banana polyphenol oxidase: preparation and properties. *Plant Physiol.* 38:508-513.

58. Paschoalino, J. E., 1978. Aspectos sobre o escurecimento do palmito durante o procesamento. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 56:175-181
59. Paulson, A. y J. Vanderstoep. 1980. Enzymatic browning of peaches: effect of giberellic acid and ethophon on phenolic compounds and polyphenol oxidase activity. *J. Food Sci.* 59:678-684.
60. Pearson, D. Seasonal english market variations in the composition of South African and Israeli avocados. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, 26, 207-213.
61. Prota, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* **1988**, 8, 525-556.
62. Quintanar, A. F. El aguacate.
63. 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.
64. Rivas, N. y J.R. Whitaker. 1973. Purication and some properties of two polyphenol oxidase from Bartlett pears. *Plant Physiol.* 52:501-507.
65. Robb, D. A. Tyrosinase. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*; Lontie, R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1984; Vol II, pp 207-240.
66. 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.

67. 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.
68. Rodríguez, S. T. 1982. El aguacate. Primera Edición.
69. 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.
70. 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.
71. Ros, J. R.; Rodríguez-López, J. N. y García-Cánovas, F. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1204, 33-42.
72. Sato, M. 1982. Multiplicity of spinach root phenolase and its monophenolase activity. *Phytochemistry* 21:1229-1231.
73. 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.
74. Sánchez, M. I. Producción y Consumo de Aguacate en México. Monografía Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. (2000).
75. Scudmore-Smith, P. D. The utilization of avocado as frozen savoury spread. *Food Technol. Aust.* **1984**, 36, 375-378.

76. 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.
77. Solares, M. 1976. Cultivo Moderno y Rentable del Aguacate. Editores Unidos Mexicanos S.A. Primera Edición. México, D.F.
78. Swisher, H. E. Avocado oil from food use to skin care. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 1704-1706.
79. Teliz, D. 2000. El aguacate y manejo integrado. Ediciones Mundi – Prensa. Primera edición.
80. Thomas, P. y M. Janave. 1973. Polyphenol oxidase activity and browning of mango fruits induced by gamma irradiation. *J. Food Sci.* *38*:1149- 1152.
81. Tropico # 1. Boletín mensual. 1999. aguacate un producto con potencial comercial. Centro de servicios al sector hortofrutícola region de occidente.
82. Vámos-Vigyázó , L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *15*, 49–127.
83. 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.

84. Vaughn K.C., A.R. Lax & S.O. Duke. 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
85. 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.
86. Waite, J. H. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced *o*-quinones. *Anal Biochem.* **1976**, 75, 211- 218.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. Whitaker, J.R. 1972. Principles of enzymology for the food science. New York. Marcell Dekker, Inc. 636 p.

91. Wills, R. B. H.; Lim, J. S. K.; Greenfield, H. Composition of Australian foods. 31. Tropical and sub-tropical fruit. *Food Technol. Aust.* **1986**, *38*, 118-120, 122-123.
92. Wisseman, K.W. y M.W. Montgomery. 1985. Purification of d'Anjou pear (*Pirus communis*) polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 78:256-262.
93. 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.