

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN**

NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN

CÓDIGO: AA-1702

Evaluación del efecto del ácido ascórbico como inhibidor de pardeamiento enzimático en el fruto de anona pulpa rosada (*Annona diversifolia*) y en la cinética de la polifenoloxidasas.

TÍTULO A OBTENER: Ingeniero Agroindustrial

AUTORES:

Nombres, apellidos	Dirección	Teléfono y correo electrónico	Firma
Gerardo Aarón Pardo Valencia	Col. Santísima Trinidad, Ayutuxtepeque, San Salvador.	7742-9475 gerardopardo_@hotmail.com	
Selvin Uriel Méndez Martínez	Final 2 AV. Sur B° El Centro, Panchimalco, San Salvador.	7452-6417 selvin19932011@gmail.com uriel19932015@hotmail.com	

DATOS DE LOS DOCENTES DIRECTORES:

Directores	Lugar de trabajo.	Teléfono y correo.	Firma.
Saúl Ovidio González Rosales, MS.	Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Dpto. Fitotecnia.	6120-4582 saulovidio_g@yahoo.com	
Lic. Msc. Norbis Salvador Solano Melara	Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Dpto. Química Agrícola	7931-0888 norbis_21@yahoo.es	

VISTO BUENO:

Coordinador General de Procesos de Graduación del Departamento: Ing. Agr. Mario Alfredo Pérez Ascencio	Firma:
Director General de Procesos de Graduación de la Facultad: Ing. Agr. Msc. Elmer Edgardo Corea Guillén	Firma:
Jefe del departamento: Ing. Agr. Msc. Fidel Ángel Parada Berríos	Firma:
	Sello:

FECHA:

Ciudad Universitaria, 05 de julio de 2017

Evaluación del efecto del ácido ascórbico como inhibidor de pardeamiento enzimático en el fruto de anona pulpa rosada (*Annona diversifolia*) y en la cinética de la polifenoloxidasas.

Pardo-Valencia GA¹, Méndez-Martínez SU¹, González-Rosales SO², Solano-Melara NS³.

RESUMEN

El estudio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, de agosto de 2016 a febrero de 2017, desarrollándose en dos etapas. En la primera se extrajo la pulpa de las anonas para hacer un puré, el cual se utilizó como representación de la pulpa que queda expuesta al rajarse de forma natural; se aplicaron concentraciones de ácido ascórbico a 0.50%, 0.70% y 0.90% (p/v) como tratamientos y uno como control al cual no se aplicó ácido ascórbico. Las unidades experimentales se almacenaron a 12 ±1 °C durante 13 días; se tomaron lecturas de pH, acidez titulable y análisis sensorial al puré de anona, determinándose que la vida estante del puré de anona sin antioxidante es de 8 días, mientras que los tres tratamientos con ácido ascórbico extendieron la vida estante a 11 días. La segunda parte comprendió el estudio cinético de la polifenoloxidasas de anona y el efecto de tres soluciones de ácido ascórbico (0.5, 0.7 y 0.9 mM) en la misma por medio de espectrofotometría, utilizando catecol como sustrato; los parámetros cinéticos de la polifenoloxidasas sin ácido ascórbico fueron de $K_m=3.64$ mM/L, $V_{max}=0.160$ mM*L⁻¹*min⁻¹ y su eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) de 0.044 a 14°C y pH de 6.1. En cuanto a los porcentajes de acción antioxidante, los tratamientos de ácido ascórbico no presentaron diferencias entre sí ($F_{2,71}=3.05$; $P=0.0536$), pero hubo diferencias significativas entre las concentraciones de catecol ($F_{7,71}=33.26$; $P<0.0001$) evaluado con un $P=0.05$, mostrando el porcentaje más alto en la concentración más baja de catecol (1 mM), siendo de 51.45% (E.E=3.33) expresado como media ajustada de los tres tratamientos.

Palabras clave: *Annona diversifolia* Saff., anona, pardeamiento enzimático, polifenoloxidasas, ácido ascórbico, inhibición, catecol.

Evaluation of ascorbic acid effect as enzymatic browning inhibitor in pink pulp anona fruit (*Annona diversifolia*) and on the polyphenol oxidase kinetics.

Pardo-Valencia GA¹, Méndez-Martínez SU¹, González-Rosales SO², Solano-Melara NS³.

ABSTRACT

The study was executed at Agricultural Science Faculty of El Salvador University, from August 2016 to February 2017; it was developed on two stages. In the first part, the anona pulp was extracted to make a puree, which was used as a representation of the pulp exposed when the shell is naturally cracked. Ascorbic acid solutions at 0.50%, 0.70% and 0.90% (w/v) were used as treatments and a treatment with no ascorbic acid application used as control. The experimental units were stored at 12 ±1 °C for 13 days while titratable acidity, pH and organoleptic characteristics of anona puree were measured; the shelf life of the anona puree without antioxidant was 8 days, meanwhile the three treatments with ascorbic acid extended the shelf life to 11 days. The second part comprised the kinetic study of anona polyphenoloxidase and the effect of three solutions of ascorbic acid (0.5, 0.7 and 0.9 mM) on it by means of spectrophotometry, using catechol as substrate; the kinetic parameters of polyphenoloxidase without ascorbic acid were $K_m=3.64$ mM/L, $V_{max}=0.160$ mM*L⁻¹*min⁻¹ and its catalytic efficiency (V_{max}/K_m)=0.044 at 14°C and pH=6.1. Ascorbic acid levels did not show

¹ Universidad de El Salvador, Departamento de Fitotecnia, Estudiantes tesisistas.

E-mail: gerardopardo_@hotmail.com

² Universidad de El Salvador, Departamento de Fitotecnia, Docente Director.

³ Universidad de El Salvador, Departamento de Química Agrícola, Docente Director.

any differences ($F_{2,71}=3.05$; $P=0.0536$), but there were significant differences between catechol concentrations ($F_{7,71}=33.26$; $P<0.0001$) tested with a $P=0.05$, showing the highest percentage in the lowest concentration of catechol (1 mM), being 51.45% ($EE=3.33$) expressed as adjusted average of the three treatments.

Key words: *Annona diversifolia* Saff., anona fruit, enzymatic browning, polyphenol oxidase, ascorbic acid, inhibition, catechol.

1. INTRODUCCIÓN

En El Salvador se encuentran nueve especies diferentes de anonas, siendo las más comunes y de mayor importancia económica la anona rosada (*Annona diversifolia* Saff.), la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), la sincuya (*Annona purpurea* Moc.) y la guanábana (*Annona muricata* L.) (Cruz Pineda 2003). A pesar que muchas personas gustan de la anona rosada (*Annona diversifolia* Saff.), no se encuentra desarrollada como un cultivo comercial y es plantada generalmente en los patios de las casas, solamente como una planta de recolección, siendo su índice de cosecha cuando los frutos se abren en el árbol (Irigoyen 2004).

Mayer (1987), citado por Sallés (2007) menciona que las frutas y vegetales son afectadas por el pardeamiento enzimático durante el crecimiento, cosecha, almacenamiento y procesado, siendo un problema de primera magnitud en la industria alimentaria y reconocido como una de las principales causas de pérdida de la calidad y valor comercial. Según Bello Gutiérrez (2000), el pardeamiento enzimático es una alteración química, aunque enzimática en sus primeras etapas, que tiene como sustratos a los compuestos fenólicos que se transforman en estructuras poliméricas poco aclaradas, por lo general con coloraciones oscuras o pardas. La enzima que cataliza el pardeamiento tiene varios nombres comunes: fenolasa, fenoloxidas, tirosinasa, polifenoloxidas, catecolasa, la cual se encuentra presente en tejidos animales y vegetales (Herrera Ramírez 2003). En las plantas, la enzima es mayormente conocida como polifenoloxidas (Guerrero 2009). Para que se produzca este pardeamiento, es necesario la presencia de tres componentes: enzima, sustrato y oxígeno. Según Denoya *et al.* (2012), actualmente se puede hacer muy poco con el sustrato oxidable; los métodos hoy en uso tienden a inhibir la enzima o a eliminar el oxígeno y algunas veces se combinan ambos métodos. Agentes reductores, antioxidantes e inhibidores enzimáticos previenen químicamente el pardeamiento, ya sea reduciendo las ortoquinonas coloreadas a difenoles incoloros, inhibiendo la actividad de la enzima por disminución del pH o quelando el Cu^{++2} del sitio activo de la enzima (Gasull y Becerra 2006).

Por otra parte, la velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede medirse con relativa facilidad por medio de la cinética enzimática; estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima frente a diferentes tipos de sustratos y agentes químicos antipardeamiento. Se conocen dos tipos principales de inhibición: la reversible y a la irreversible; según Gago (2008), la primera implica una unión “no covalente” del inhibidor y, por lo tanto, siempre puede revertirse; en la inhibición irreversible, el inhibidor se une al enzima de forma “covalente” y permanente.

El propósito de la investigación está orientado a contribuir al manejo poscosecha del fruto de anona, por medio de la aplicación de soluciones de ácido ascórbico para controlar el pardeamiento de la pulpa ocasionado por enzimas oxidoreductasas como la polifenoloxidas, que disminuyen la calidad de la anona, ya que El Salvador enfrenta grandes retos en mejorar la seguridad alimentaria, no solo como una exigencia moral sino como una condición previa para alcanzar su desarrollo sostenible.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción del estudio

El estudio se realizó de agosto de 2016 a febrero de 2017, desarrollándose en dos etapas:

En la primera etapa se cosecharon las anonas de un mismo lote de la Hacienda Santa Bárbara del cantón Cerco de Piedra, municipio de Rosario de Mora, departamento de San Salvador, El Salvador. Sus coordenadas geográficas son las siguientes: 13° 35' 14" LN (extremo septentrional) y 13° 28' 48" LN (extremo meridional); 89° 11' 04" LWG (extremo oriental) y 89° 13' 57" LWG (extremo occidental) a 76 metros sobre el nivel del mar. Después se trasladaron al laboratorio de Protección Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. Se extrajo la pulpa de las anonas para hacer un puré, el cual se utilizó como representación de la pulpa que queda expuesta al rajar la cáscara de la fruta; se aplicaron concentraciones de ácido ascórbico a 0.50%, 0.70% y 0.90% (p/v) como tratamientos, y se utilizó como testigo un tratamiento al cual no se aplicó ácido ascórbico. Se almacenó el puré de anona por 13 días a una temperatura de $12 \pm 1^\circ\text{C}$.

En la segunda etapa se extrajo la Polifenoloxidasa (PPO) del fruto de anona rosada (*Annona diversifolia* Saff.) para determinar sus parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) utilizando catecol como sustrato a diferentes concentraciones. También se evaluó el efecto del ácido ascórbico a tres concentraciones (0.5 mM, 0.7 mM y 0.9 mM) y un blanco o testigo al cual no se aplicó ácido ascórbico. Esta etapa se desarrolló en el laboratorio de Investigación de Suelos del departamento de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

2.2. Metodología de Campo

2.2.1. Recolección de anonas para el estudio

La recolección de los frutos se realizó de forma manual, utilizando un cosechador para no dañar la cáscara del fruto. El índice de cosecha que se utilizó es cuando el fruto empieza a abrirse, de lo contrario el fruto no alcanza su madurez de consumo

Preparación de pulpa

Recepción de materia prima: las anonas (*Annona diversifolia* Saff.) maduras se inspeccionaron, se pesaron y almacenaron hasta el momento de su procesamiento.

Lavado: las anonas se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a 200 ppm para eliminar microorganismos patógenos.

Pelado: se eliminó en su totalidad la cáscara y las semillas de las anonas lo más rápido posible para evitar el pardeamiento enzimático.

Despulpado: En esta etapa se homogenizó la pulpa en licuadora previamente refrigerada y se agregó al puré de anona sorbato de potasio ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$) al 0.2 % p/v grado alimenticio como conservante (Menjivar y Vanegas 2014).

Envasado: el puré se colocó en tarros de boca ancha con capacidad de 20 gramos. Cada contenedor se identificó según el tratamiento evaluado.

Aplicación de antioxidantes: se aplicó un promedio de 0.8 ml de solución antioxidante mediante el uso de un atomizador en la superficie del puré de anona de cada muestra.

Almacenamiento en refrigeración: el puré se almacenó a $12 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 13 días, tiempo en el que se realizaron lecturas de pH, acidez titulable y análisis sensorial.

2.2.2. Desarrollo de panel sensorial

La capacitación de los jueces que conformaron el panel entrenado para el análisis sensorial de la anona, comprendió las etapas siguientes:

Etapas de preselección: se invitaron a participar como voluntarios para conformar el panel sensorial a estudiantes de 4º a 5º año y egresados de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. Se seleccionaron ocho mujeres y ocho hombres a los que se les tomó los datos de su información personal como nombre, edad, sexo, estado de salud, su frecuencia de consumo de anona, hábitos alimentarios, si fuma, consume bebidas alcohólicas, café, condimentos y alimentos que puedan dañar su sentido del gusto.

Etapas de selección: consistió en dos pruebas para percepción de sabores y dos pruebas para diferenciar escalas de colores similares al de la pulpa de anona: Prueba 1: Prueba de sensibilidad a los sabores básicos para determinar los Umbrales de sabor. Prueba 2: Capacidad para identificar sabores y ordenar intensidades. Prueba 3: Habilidad para diferenciar escalas de color. Prueba 4: fue réplica de la prueba 3, para diferenciar escalas de color.

Etapas de entrenamiento: de las etapas anteriores se seleccionó un grupo de diez personas. Para el entrenamiento los panelistas degustaron anona rosada y anona blanca (*Annona diversifolia* Saff.) para que conocieran las características organolépticas que tiene cada variedad; por consenso determinaron cada descriptor de sabor y color para la elaboración del perfil de anona.

2.3. Metodología de Laboratorio

2.3.1. Evaluación de la pulpa de anona

Se evaluó la pulpa de anona (*Annona diversifolia* Saff.) con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (0.00, 0.50, 0.70 y 0.90% p/v) y se sometió a una temperatura de almacenamiento de 12 ± 1 °C durante 13 días, en los que se tomaron medidas de pH y acidez titulable por duplicado, evaluando a la vez sus características organolépticas. Las lecturas se tomaron en los días 0, 4, 8, 11 y 13 de almacenamiento, teniendo cuatro repeticiones por tratamiento.

2.3.2. Método para determinar el pH (AOAC 1980)

Procedimiento realizado (AOAC 1980):

- ✓ Colocar la muestra en un vaso de precipitado.
- ✓ Cerciorarse que la temperatura este a 20°C.
- ✓ Sumergir la membrana de vidrio del pH-metro.
- ✓ Tomar la lectura cuando se establezca la medida.

2.3.3. Método para determinar la acidez titulable (AOAC 1980)

Procedimiento realizado (AOAC 1980):

- ✓ Tomar 10 ml de muestra.
- ✓ Enrasar a 50 ml con agua destilada.
- ✓ Titular con una solución de NaOH 0.1 N utilizando azul de bromotimol como indicador, hasta que vire de amarillo a azul.
- ✓ Calcular la acidez titulable utilizando la siguiente fórmula:

$$\%AT = \frac{V * N * E}{A} * 100$$

Donde:

- ✓ **V**: ml de NaOH gastados en titulación
- ✓ **N**: Normalidad del NaOH
- ✓ **E**: Miliequivalente
- ✓ **A**: Gramos o ml de muestra

2.3.4. Análisis sensorial

El panel sensorial conformado por diez jueces entrenados, cinco mujeres y cinco hombres, utilizó la siguiente escala de intensidad para el análisis: 5=extrema, 4=grande, 3=media, 2=ligera, 1=casi imperceptible y 0=ausencia total (de indicación obligada). El perfil se desarrolló con datos promedios de los jueces participantes; además, se incluyó la evaluación general del puré sobre la aptitud de la muestra para consumo.

2.3.5. Cinética de la polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.)

El siguiente procedimiento es una adaptación de los métodos descritos por Boyer citado por Miller (2003) y Amaya *et al.* (2008):

Al recibir las anonas (*Annona diversifolia* Saff.), se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 horas antes de obtener el extracto acuoso de la Polifenoloxidasas.

Extracción de la enzima Polifenoloxidasas:

- El procedimiento se hizo a 4 °C. Se retiró la cáscara y semillas a los frutos de anona, después fueron cortados y homogenizados con una licuadora común.
- Posteriormente se pesaron 20 g de pulpa en una balanza analítica y se mezclaron con 100 ml de buffer fluoruro de sodio 0.1 M (0.1M de Na₂HPO₄ y 0.1M NaF, pH=5.7), esta mezcla fue licuada durante 1 minuto aproximadamente y se centrifugó a 4500 rpm a 4 °C durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada marca Thermo® IEC Centra CL3R.
- El precipitado resultante fue filtrado a través de un algodón estéril y posteriormente se efectuó una segunda filtración con un filtro Whatman™ No.42 (110 µm Ø) para eliminar la turbidez del extracto. El extracto se mantuvo a 4°C en refrigerador marca LG GT46HGP.

2.3.6. Estudio cinético

- El estudio cinético se realizó mediante espectrofotometría, analizando el efecto inhibitorio de tres soluciones de ácido ascórbico sobre la Polifenoloxidasas en dicha reacción. Las soluciones fueron las siguientes 0.00 mM, 0.5 mM, 0.7 mM y 0.9 mM de ácido ascórbico.
- Se tomó lecturas de absorbancia a 420 nm en intervalos de 15 segundos durante 2.5 minutos, usando Catecol como sustrato a diferentes concentraciones en solución buffer fosfato de sodio 0.2M Na₂HPO₄ y pH=6.1. Todas las medidas de velocidad inicial se tomaron por duplicado a 14 °C.
- Se tuvo un blanco con 2.5 ml del buffer fosfato de sodio (0.2M Na₂HPO₄, pH=6.1) y 0.5 ml de extracto enzimático.

Se preparó el espectrofotómetro (marca Thermo® Spectronic Genesys 20) a 420 nm, llevando a cero de absorbancia con la solución preparada como blanco. La reacción fue iniciada adicionando el extracto enzimático al tubo que contenía el regulador fosfato de sodio, el Catecol y el inhibidor; se mezcló y se tomó la lectura inmediatamente a intervalos de 15 segundos durante 2.5 minutos para cada tubo.

Para cada concentración de catecol se calculó la velocidad de reacción por minuto, utilizando la siguiente fórmula:

$$V = \frac{\Delta A}{\sum b \Delta t}$$

Dónde:

- **V**: velocidad de reacción
- **A**: absorbancia
- Σ : coeficiente de absorbancia
- **b**: es la longitud de la trayectoria luminosa (1 cm)
- **t**: tiempo (un minuto)

Se determinó el comportamiento de reacción de la polifenoloxidasas, elaborando la gráfica de la cinética de Michaelis-Menten y para determinar las constantes K_m y la V_{max} se utilizó la gráfica de Lineweaver-Burk.

2.3.7. Porcentaje de acción antioxidante

Se evaluó el porcentaje de acción antioxidante de las tres concentraciones de ácido ascórbico (0.5, 0.7 y 0.9mM) sobre la reacción de la polifenoloxidasas con el Catecol (sustrato) a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 mM. El porcentaje de acción antioxidante se determinó de acuerdo a Özoğlu (2002), empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de ac}(\%) = \left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) * 100$$

Donde:

- ✓ **Ac**= Absorbancia tomada luego de haber transcurrido un minuto de la muestra control o testigo.
- ✓ **At**= Absorbancia tomada luego de haber transcurrido un minuto de la muestra del tratamiento.

2.4. Metodología Estadística

Para los datos provenientes de las pruebas organolépticas, se ajustó un modelo lineal generalizado mixto con distribución multinomial y función de enlace acumulativa para cada descriptor de color y sabor, considerando siempre a los evaluadores como factores aleatorios. Los modelos fueron ajustados utilizando la función *clmm()* del paquete ordinal (Christensen 2015), las tablas de análisis de varianza fueron obtenidas con la función *Anova()* del paquete car (Fox y Weisberg 2011); también se realizaron comparaciones pareadas con la prueba HSD de Tukey obtenidas mediante el paquete lsmeans (Lenth 2016), a un nivel de significancia del 5%. Los análisis se llevaron a cabo en el programa R versión 3.3.2 (RCT 2016).

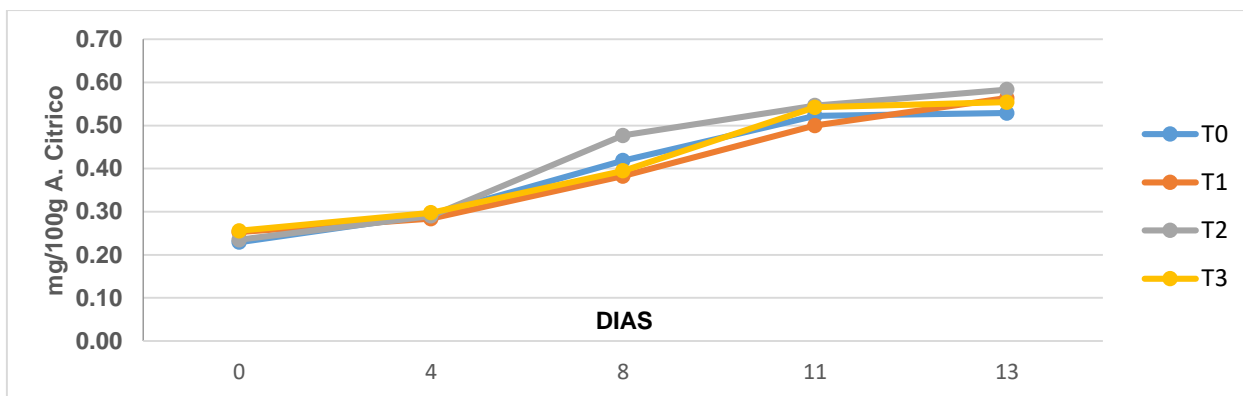
La inhibición de la enzima polifenoloxidasas fue evaluada aplicando un modelo lineal mixto en el porcentaje de inhibición enzimática, tomando como factor aleatorio los frutos de los cuales se obtuvo la pulpa, a un nivel de significancia del 5%. El modelo fue ajustado utilizando el programa InfoStat versión 9.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis fisicoquímico

a) Acidez Titulable:

Los valores de acidez presentaron una tendencia a la alza desde 0.23 hasta 0.58 mg/100 g de ácido cítrico a lo largo de 13 días; siendo similares entre tratamientos sin verse afectados por la adición de ácido ascórbico aplicados según se observa en la figura 1.



T0= pulpa sin antioxidante.

T1= pulpa con solución AA al 0.50% p/v

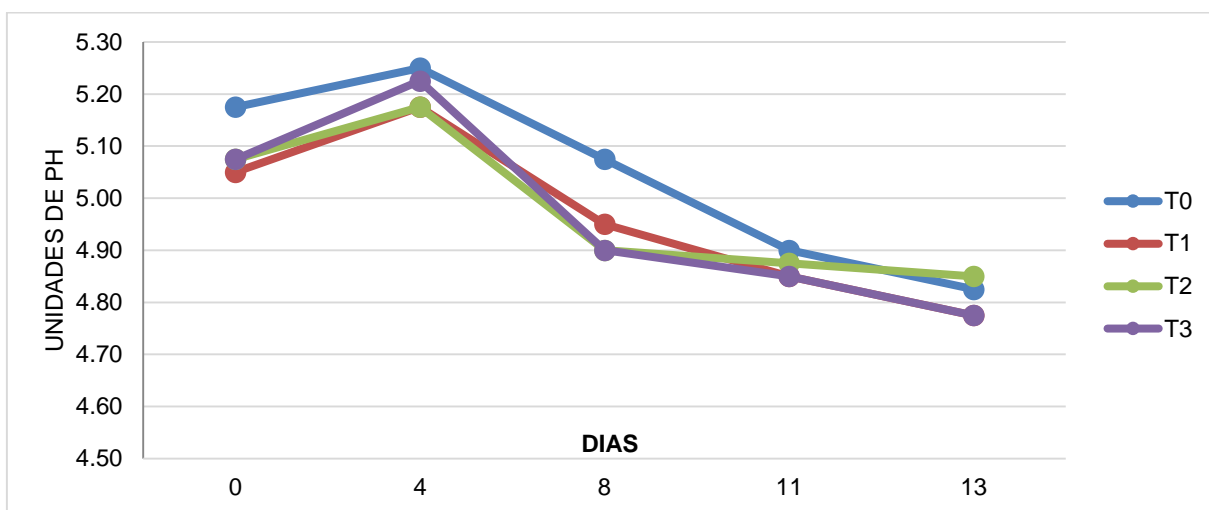
T2= pulpa con solución AA al 0.70% p/v

T3= pulpa con solución AA al 0.90% p/v

Figura 1. Comportamiento de la acidez titulable de la anona (*Annona diversifolia* Saff.) con la adición de ácido ascórbico, en un periodo de 13 días a una temperatura de $12 \pm 1^\circ\text{C}$.

b) Comportamiento del pH:

El pH en pulpa de anona se comportó a la baja (figura 2), presentado un rango que va desde 5.05 hasta 4.78 a los 13 días de evaluación, a una temperatura de $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Los tratamientos de ácido ascórbico (0.5%, 0.7% y 0.9% p/v) mostraron un comportamiento similar. El efecto enzimático actuó con total normalidad, ya que según Materano *et al.* (2004) los niveles pH en la que la enzima reduce su actividad se encuentra por debajo de 3.8.



T0= pulpa sin antioxidante.

T1= pulpa con solución AA al 0.50% p/v

T2= pulpa con solución AA al 0.70% p/v

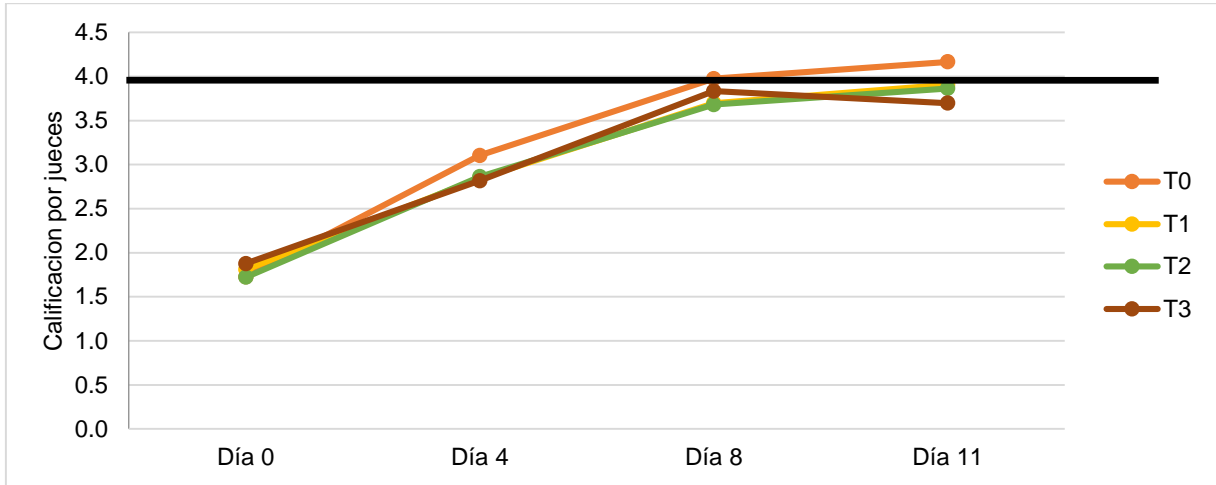
T3= pulpa con solución AA al 0.90% p/v

Figura 2. Comportamiento del pH de la anona (*Annona diversifolia* Saff.) con la adición de ácido ascórbico, en un periodo de 13 días a una temperatura de $12 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2. Determinación de vida estante

Mediante la boleta de evaluación se pidió a cada panelista que emitieran su opinión en cuanto aceptabilidad del atributo oscurecimiento. Cuando este alcanzase notas igual o mayor a 4 (percepción "Fuerte" del atributo), esto indicaba que la muestra ya no era agradable para el juez. De esta manera se determinó el tiempo de vida estante del puré.

En la figura 3 se muestra el comportamiento del cambio de color que fue de tonos rosados claros a cafés oscuros, causado por la oxidación de la polifenoloxidasas. Se observa una similitud entre los cuatro tratamientos para los mismos días de evaluación. El tratamiento testigo (T0) alcanzó la calificación 4 (percepción “Fuerte” del atributo) en el día 8 en cuanto a la intensidad del oscurecimiento y obtuvo las calificaciones más altas a comparación de los tratamientos con ácido ascórbico (T1, T2 y T3) durante los 11 días.



T0= pulpa sin antioxidante.

T1= pulpa con solución AA al 0.50% p/v

T2= pulpa con solución AA al 0.70% p/v

T3= pulpa con solución AA al 0.90% p/v

Figura 3. Comportamiento del atributo oscurecimiento durante 11 días a temperatura de 12 ± 1 °C, para determinar vida estante en anona (*Annona diversifolia* Saff.).

En la figura 4 se presenta el comportamiento de cada uno de los tratamientos durante un periodo de 11 días a temperatura de 12 ± 1 °C, en puré anona (*Annona diversifolia* Saff.) evaluado por panelistas entrenados.

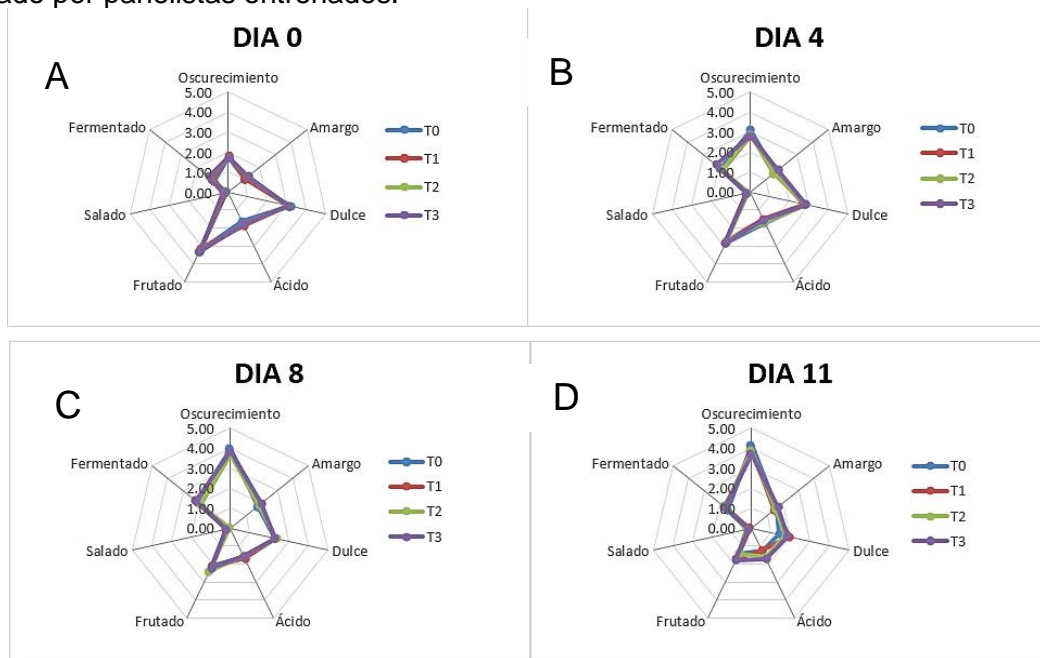


Figura 4. Comportamiento de los tratamientos a través del tiempo.

Según los criterios emitidos por los diez panelistas en puré de anona para los cuatro tratamientos (0.00, 0.50, 0.70 y 0.90% p/v) de ácido ascórbico, los panelistas percibieron diferencias para las variables sensoriales: ácido y amargo; con el paso del tiempo estos atributos mostraron una tendencia a ser más perceptibles. Mientras tanto, para otros atributos como sabores frutado y dulce presentaron una tendencia totalmente diferente, ya que a medida pasaban los días su intensidad fue reduciéndose. Finalmente los sabores que no generaron mayor relevancia en el estudio debido a su poca o nula percepción en las muestras, son los descriptores fermentado y salado (figura 4).

La figura 4 presenta una similitud entre los perfiles del puré de anona de los cuatro tratamientos evaluados; pero se observa que el panel de catación identificó diferencias en la percepción de las características organolépticas del fruto a lo largo del tiempo.

3.3. Análisis estadístico de la percepción de los descriptores

• Acido

El análisis sensorial realizado al puré de anona, mostró diferencias significativas de acuerdo a la adición de soluciones de ácido ascórbico en diferentes concentraciones ($\chi^2_3=10.72$, $P=0.013$). Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en acidez de las muestras fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=9.70$, $P=0.0212$). La interacción de tratamientos y días presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=30.3$, $P=0.0003$) para el atributo “ácido”.

• Amargo

El análisis sensorial realizado al puré de anona, no mostró diferencias entre muestras presentadas de acuerdo a la adición de soluciones de ácido ascórbico en diferentes concentraciones ($\chi^2_3=5.15$, $P=0.1611$). Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en amargo fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=37.23$, $P=4.10e^{-08}$). La interacción de tratamientos y días no presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=2.74$, $P=0.9736$) para el atributo “amargo”.

• Dulce

El análisis sensorial realizado al puré de anona, para el atributo dulce no mostró diferencias entre muestras presentadas de acuerdo a la adición de soluciones de ácido ascórbico en diferentes concentraciones ($\chi^2_3=0.056$, $P=0.81$). Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en cuanto al descriptor dulce fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=46.40$, $P=9.620e^{-12}$). En cuanto a la interacción de tratamientos y días no presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=0.4556$, $P=0.5043$) para el atributo “dulce”.

• Frutado

El análisis sensorial realizado al puré de anona, para el atributo frutado no mostró diferencias entre muestras presentadas de acuerdo a la adición de soluciones de ácido ascórbico en diferentes concentraciones ($\chi^2_3=1.18$, $P=0.7567$). Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en el descriptor frutado fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=256.19$, $P=3.00e^{-55}$). En cuanto a la interacción de tratamientos y días no presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=8.21$, $P=0.5128$) para el atributo “dulce”.

3.4. Cinética de la Polifenoloxidasa de anona (*Annona diversifolia* Saff.)

3.4.1. Comportamiento de Polifenoloxidasa de anona sin antioxidante

Las absorbancias de la oxidación del Catecol (sustrato) con Polifenoloxidasa de Anona se relacionaron con el tiempo y se determinó el valor de la velocidad de reacción para cada concentración de sustrato. Éstas presentaron una relación hiperbólica a medida aumentaba la concentración del sustrato (figura 5-A). Según Miller (2003), las enzimas que presentan esta relación obedecen la cinética de Michaelis-Menten, observándose que a bajas

concentraciones de sustrato, la velocidad está relacionada en forma casi lineal con la concentración de sustrato, mientras que a concentraciones altas de sustrato, la velocidad casi no es afectada por los cambios de concentración del sustrato formándose una hipérbola.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la gráfica Lineweaver-Burk (figura 5-B) fueron $K_m=3.64$ mM/L, $V_{max}=0.160$ mM*L⁻¹*min⁻¹ y su eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) de 0.044. Donde V_{max} indica el número de moléculas de sustrato que se convierten en producto por unidad de tiempo y K_m es igual a la concentración del sustrato a la cual la rapidez de la reacción es la mitad de su valor máximo (Miller 2003). El valor de K_m hallado en este estudio fue muy similar a las cinéticas de PPO en pulpa sin refinar de “banano” *Musa acuminata* x *balbisiana* (Chong 2009) y en “rúcula” *Eruca sativa* (Landi 2013) 3.77 mM/L y 4.16 mM/L respectivamente.

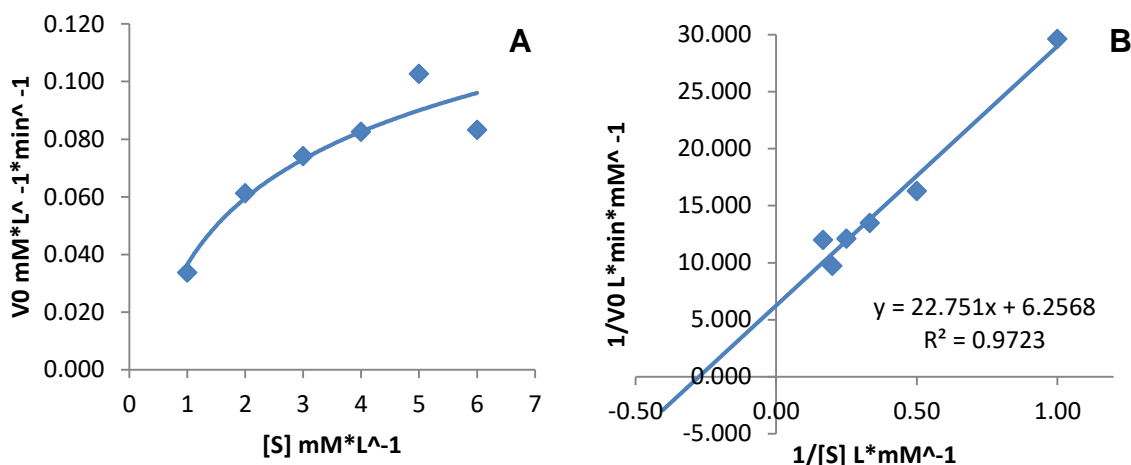


Figura 5. Gráficos de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) para la cinética de Polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1.

3.4.2. Análisis del comportamiento de Polifenoloxidasas de anona en presencia de ácido ascórbico

El efecto del ácido ascórbico sobre la polifenoloxidasas ha sido polémico en los últimos años; se ha estudiado su efecto mayormente por su amplio uso en la industria de alimentos (Guerrero 2009). Algunos informes atribuyen su acción a la reducción de las quinonas formadas a los difenoles incoloros originales; otros consideran al ácido ascórbico como un inhibidor de PPO (Pizzocaro 1993). Sin embargo, la condición requerida para poseer cada mecanismo no está definida.

El cálculo de las constantes de Michaelis (K_m) y las velocidades máximas (V_{max}) de la Polifenoloxidasas en presencia de Ácido Ascórbico (AA) a concentraciones de 0.5mM, 0.7mM y 0.9mM mostraron valores negativos (cuadro 1).

Cuadro 1. Parámetros cinéticos para los tratamientos en estudio de ácido ascórbico sobre la polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1.

Parámetros cinéticos	Control	0.5 mM de AA	0.7 mM de AA	0.9 mM de AA
K_m (mM/L)	3.64	-74.14	-31.44	-9.91
V_{max} (mM*L ⁻¹ *min ⁻¹)	0.160	-1.534	-0.594	-0.125

Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) indican la afinidad de la enzima hacia el sustrato; al estar la PPO en presencia de un inhibidor como el ácido cítrico o EDTA por ejemplo, el menor valor que pueden tomar K_m y V_{max} es 0, ya que los inhibidores actúan directamente en la enzima, disminuyendo o deteniendo su catálisis.

En cuanto al ácido ascórbico, algunos autores asumen que no inhibe directamente la PPO, sino que es capaz de reducir las o-quinonas generadas por la enzima al difenol original, limitando el pardeamiento a través de un proceso conocido como reacción de desactivación, por lo que es catalogado como un antioxidante (Landi 2013 y Ali 2014); sin embargo, éste confiere una protección temporal por oxidarse a ácido dehidroascórbico (DHAA), en el proceso de pardeamiento, permitiendo que la quinona se acumule y tenga un efecto contrario (Guerrero 2009).

Conociendo su efecto, puede plantearse la hipótesis que debido a que el ácido ascórbico reacciona de manera opuesta a la enzima (figura 6), al ser mayor su efecto para reducir la quinona que la acción de la PPO por producirla, justifica que los tratamientos con ácido ascórbico evaluados en este estudio muestran valores negativos de K_m y V_{max} .

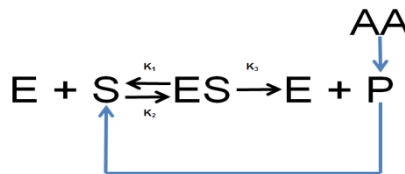


Figura 6. Efecto del ácido ascórbico sobre la quinona formada en la reacción enzimática. Fuente: elaboración propia.

3.4.3. Tipo de inhibición del ácido ascórbico sobre la Polifenoloxidasas (PPO)

El análisis por medio de la representación de los dobles inversos de las distintas rectas de los tratamientos (figura 7), muestra que el ácido ascórbico presenta una similitud al mecanismo de inhibición de tipo competitivo, con la diferencia que las distintas rectas no interceptan en el mismo punto (para $X=0$).

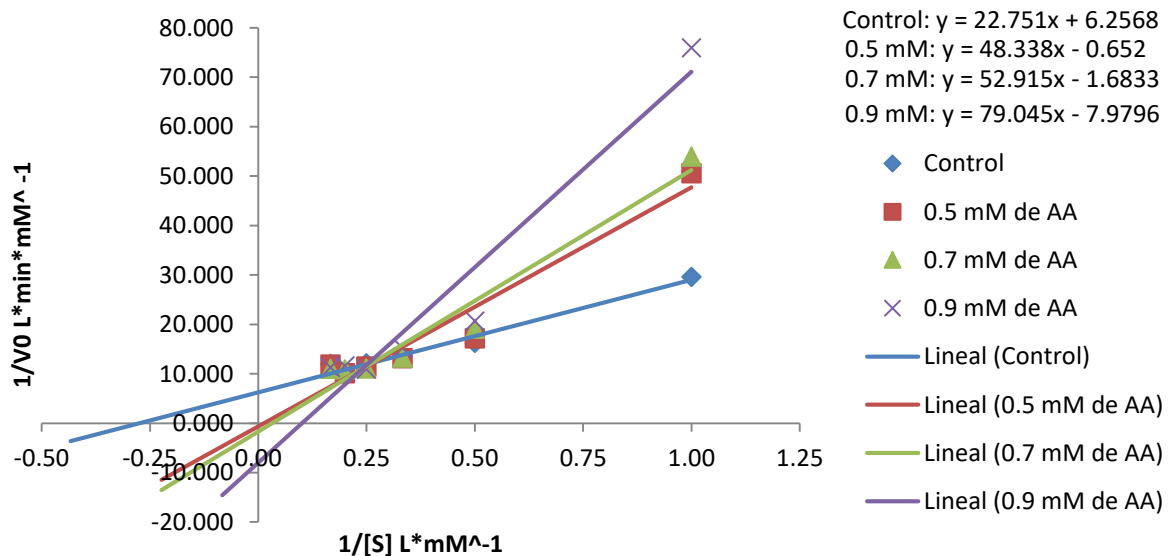


Figura 7. Gráfico Lineweaver-Burk de los tratamientos de ácido ascórbico sobre la polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1.

Algunos autores han encontrado una inhibición competitiva ejercida por el ácido ascórbico en PPO de menta (Kavrayan 2001) y de PPO de alcachofa (Aydemir 2004). Por otra parte, para que un agente antipardeamiento actúe como inhibidor competitivo, debe cumplir con lo siguiente:

- ✓ Ser una sustancia similar en estructura al sustrato, para competir por el sitio activo de la enzima.
- ✓ En la representación del gráfico Lineweaver-Burk las distintas rectas deben cortar en el mismo punto de $1/V_{max}$ (para $X=0$), indicando que la V_{max} permanece constante independientemente de utilizar diferentes concentraciones del mismo inhibidor; además, existen varios puntos de corte en $-1/K_m$ cuando $Y=0$, por tanto aparentemente varias K_m , que además van aumentando con la concentración del inhibidor, reflejando que la enzima en presencia del mismo pierde afinidad por el sustrato.

En contraste con el ácido ascórbico, su efecto es sobre la quinona formada por la reacción enzimática con el sustrato, transformándola al difenol original; asimismo en la figura 7, gráfico Lineweaver-Burk, las líneas rectas de los tratamientos evaluados en este estudio (0.5mM, 0.7mM y 0.9mM de ácido ascórbico) interceptaron en diferentes puntos negativos del eje Y cuando $X=0$ ($-1/V_{max}$) y en diferentes puntos positivos del eje X cuando $Y=0$ ($1/K_m$). Por tanto, el ácido ascórbico no cumple con las características de un inhibidor competitivo para ser catalogado como tal, sino como antioxidante.

3.4.4. Porcentaje de acción antioxidante en diferentes concentraciones de Catecol

En cuanto a los porcentajes de acción antioxidante, los tratamientos de ácido ascórbico a concentraciones de 0.5, 0.7 y 0.9mM no presentaron diferencias entre sí ($F_{2,71}=3.05$; $P=0.0536$), pero hubo diferencias significativas en los porcentajes de acción antioxidante entre las concentraciones de catecol ($F_{7,71}=33.26$; $P<0.0001$). Por otra parte, no hubo interacción de los tratamientos de ácido ascórbico con catecol ($F_{14,71}=1.59$; $P=0.1023$).

La figura 8 muestra que los tratamientos de ácido ascórbico presentaron el porcentaje de acción antioxidante más alto en la concentración de 1 mM de Catecol, siendo de 51.45% (E.E=3.33) expresado como media ajustada de los tres tratamientos. Mientras que se muestra un declive del porcentaje de acción antioxidante a medida aumentó la concentración de Catecol hasta la concentración de 4 mM y una variación desde la concentración 5 mM a la de 8 mM.

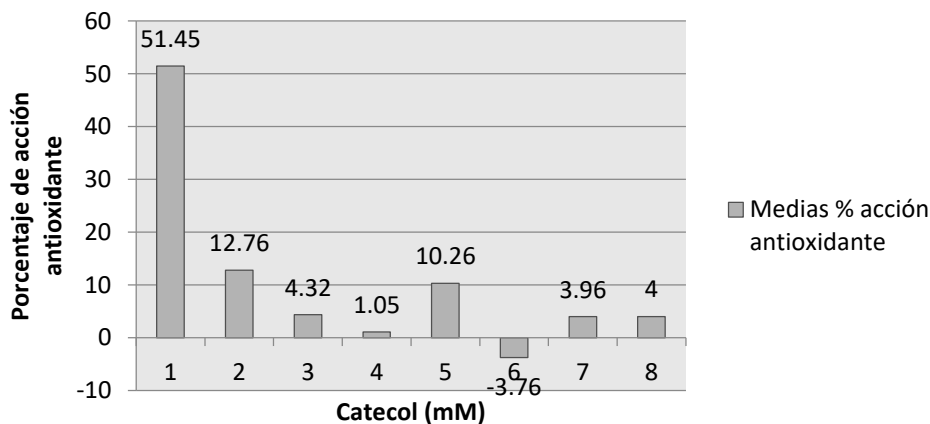


Figura 8. Porcentaje de acción antioxidante del ácido ascórbico sobre la polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1

El declive en las concentraciones de 1 a 4 mM de Catecol y la variación en las concentraciones de 5 a 8 mM en el porcentaje de acción antioxidante, puede deberse al K_m de la PPO de anona (3.64 mM/L), el cual indica la concentración de Catecol (sustrato) a la que la enzima alcanza la mitad de su velocidad máxima, como también la PPO obedece la cinética de Michaelis-Menten, aumentando su actividad de forma lineal a medida aumenta la concentración de sustrato hasta llegar al punto de su K_m , pero al sobrepasarlo, la actividad enzimática deja de ser lineal e independiente de la concentración de sustrato, en donde se nota una curva hasta que poco a poco se vuelve prácticamente una línea constante.

4. CONCLUSIONES

Se puede obtener resultados igual de satisfactorios al aplicar ácido ascórbico en puré de anona a concentraciones de 0.50, 0.70 y 0.90% p/v, lo cual prolonga su vida estante a 11 días, extendiendo en un mínimo de tres días su vida estante a comparación del puré de anona sin ácido ascórbico.

Las cualidades organolépticas del puré de anona no fueron afectadas por las diferentes concentraciones de ácido ascórbico, ya que los tres tratamientos presentaron perfiles organolépticos similares al tratamiento testigo.

El comportamiento del pH y acidez titulable no se vieron afectados por las concentraciones de ácido ascórbico (0.50, 0.70 y 0.90% p/v), presentando una tendencia similar al tratamiento testigo (sin ácido ascórbico). Por tanto, el ácido ascórbico no actuó como acidulante a las concentraciones utilizadas.

La polifenoloxidasasa de anona (*Annona diversifolia* Saff.) cumple la cinética de Michaelis-Menten, ya que presenta una relación hiperbólica a medida aumenta la concentración de Catecol (sustrato).

El ácido ascórbico no cumple con las características de un inhibidor competitivo, sino como la de un antioxidante; siendo su efecto el de reducir las quinonas formadas producto de la reacción de la polifenoloxidasasa con los sustratos, devolviendo las quinonas a los difenoles originales (sustratos).

Los tres tratamientos de ácido ascórbico (0.5, 0.7 y 0.9mM) produjeron similares efectos en el porcentaje de acción antioxidante en el pardeamiento de anona, de modo que es posible obtener resultados satisfactorios en reducción del pardeamiento con estas tres concentraciones.

5. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones relacionadas al control del pardeamiento enzimático utilizando otros agentes inhibidores para verificar su eficiencia sin que altere las propiedades organolépticas en el fruto de anona.

Evaluar la vida útil de anona empleando concentraciones más altas de ácido ascórbico, diferentes temperaturas de almacenamiento y en atmósferas controladas o modificadas.

Realizar estudios cinéticos para determinar pH y temperatura óptima para la actividad enzimática de la polifenoloxidasasa (PPO) de anona.

Evaluar otros sustratos en el estudio cinético como por ejemplo L-Dopa o ácido clorogénico, para comparar sus constantes de Michaelis (K_m) y así, conocer con qué tipo de sustrato la polifenoloxidasasa de anona presenta mayor afinidad.

Investigar por medio del estudio cinético el mecanismo de inhibición de otros agentes químicos que se comportan como inhibidores, por ejemplo cisteína, ácido cítrico y EDTA, con el fin de conocer cómo es afectada la actividad de la PPO de anona en presencia de éstos.

Realizar investigaciones relacionadas a la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante de estos compuestos presentes en la anona, para conocer qué tipo de difenoles (sustrato) se encuentran en mayor proporción en este fruto.

6. BIBLIOGRAFÍA

Ali, H. 2014. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. *Journal of Food Science and Technology* 52(6):3651–3659

Amaya, E; Tarkus, R; Dominguez, M. 2008. Extracción y caracterización cinética de la enzima polifenoloxidasas del aguacate (*Pseuda albertschkeana* MILLER) var. Hass. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química* no. 47: 10-16.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists, US). 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Ed. W Horwitz. 13 ed. Washington, DC. 1018 p.

Aydemir, T. 2004. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from artichoke (*Cynaria scolymus* L.) heads. *Food Chem* 87:59–67.

Bello Gutiérrez, J. 2000. Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Madrid, ES. Ediciones Díaz de Santos. 596 p.

Chong, C. 2009. Propiedades de polifenoloxidasas obtenidos de la pulpa y piel de *Musa acuminata x balbisiana* Colla cv. "Pisang Awak". *CyTA - Journal of Food* 9:25-30.

Christensen, R. 2015. Ordinal - Regression Models for Ordinal Data. R package version 2015.6-28 (en línea). Consultado el 17 ene. 2017. Disponible en <http://www.cran.r-project.org/package=ordinal/>.

Cruz Pineda, E. 2003. Cultivo de la anona (en línea). La Libertad, SV. Consultado: 20 de Jul. 2016. Disponible: <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/Guia%20anona%202003.pdf>

Denoya, F. 2012. Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. *RIA* 38(3) p 263-267.

Fox, J; Weisberg, S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage (en línea). Consultado el 17 ene. 2017. Disponible en: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/~jfox/Books/Companion>

Gago, J. 2008. Cinética Enzimática (en línea). Madrid, ES. Consultado el 8 ene. 2016. Disponible en: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/btg/personales/jvsgago/fundamentals%20de%20biocatalisis%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf>

Gasull, E; Becerra, D. 2006. Caracterización de Polifenoloxidasas Extraídas de Pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). *Información Tecnológica*. 17(6):69-74.

Guerrero, C. 2009. Inhibición de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas extraída del banano (*Cavendish valery*) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. Tesis MSc. Medellín, CO, Universidad Nacional de Colombia. 91 p.

Herrera Ramírez. 2003. Química de alimentos: manual de laboratorio. San José, Universidad de Costa Rica. San José, CR, 2 ed. 142 p.

Irigoyen, N. 2004. Guía Técnica del cultivo de la Anona. IICA- FRUTAL ESMAG, Santa Tecla, El Salvador. 36 p.

Kavrayan D. 2001. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). Food Chem 74:147–154.

Landi, M. 2013. Role of ascorbic acid in the inhibition of polyphenol oxidase and the prevention of browning in different browning-sensitive *Lactuca sativa var. capitata* (L.) and *Eruca sativa* (Mill.) stored as fresh-cut produce. Journal of the Science of Food and Agriculture 93(8).

Lenth, R. 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. Journal of Statistical Software, 69(1), 1-33.

Materano, W; Cortez, C; Díaz, C. 2004. Influencia de recubrimientos de quitosano con aceites esenciales de cítricos sobre la vida útil de mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente procesado (En línea). Medellín, COL. Consultado 2 de Nov. 2016. Disponible: <http://www.redalyc.org/pdf/1799/179939267008.pdf>

Menjivar, J; Vanegas, A. 2014. Efecto del ácido etilendiaminatetraacético en la actividad de la polifenol oxidasa en puré de mango (*Mangifera indica* var. Haden). Tesis Ing. Agroin. Tegucigalpa, HN, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 23p.

Miller, D. 2003. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. Trad. MC Sangines. México D.F., MX, Limusa. p. 58-68. (Serie Alimentos – Análisis – Manuales de laboratorio)

Özoğlu, H. 2002. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. Food Control 4(13):213–221.

Pizzocaro, F. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. Journal of Food Processing and Preservation 17(1993):21-30.

RCT (R Core Team). 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AU. Consultado el 17 ene. 2017. Disponible en <https://www.R-project.org/>.

Sallés, S. 2007. Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. Algerie): enzimología y fisiología de las polifenoloxidasas. Tesis Dr. Alicante, ES, Universidad de Alicante. 196 p.