

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**“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 POLIFENOLOXIDASA.”**

POR:

GERARDO AARÓN PARDO VALENCIA

SELVIN URIEL MÉNDEZ MARTÍNEZ

SAN SALVADOR, JULIO DE 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



**“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 POLIFENOLOXIDASA.”**

POR:

GERARDO AARÓN PARDO VALENCIA

SELVIN URIEL MÉNDEZ MARTÍNEZ

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

SAN SALVADOR, JULIO DE 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

Lic. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL:

Lic. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

ING. AGR. M.Sc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO:

ING. AGR. M.Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA:

ING. AGR. M.Sc. FIDEL ÁNGEL PARADA BERRÍOS

DOCENTES DIRECTORES:

SAÚL OVIDIO GONZÁLEZ ROSALES, MS.

Lic. NORBIS SALVADOR SOLANO MELARA

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN:

ING. AGR. MARIO ALFREDO PÉREZ ASCENCIO

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a Dios por habernos acompañado y guiado a lo largo de nuestra carrera, por la fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencias y felicidad.

Así también agradecemos a los docentes directores Saúl Ovidio González Rosales, MS, Lic. Norbis Salvador Solano Melara, como también al Ing. Miguel Rafael Paniagua por su apoyo en el área estadística y su tiempo invertido para brindarnos los conocimientos necesarios en la realización de este trabajo.

Al Comité Evaluador Lic. Juan Agustín Cuadra Soto e Inga. Sara Elizabeth Orellana por haber contribuido con su valioso aporte técnico y científico a lo largo de la investigación. De la misma manera al Coordinador de Procesos de Graduación del Departamento de Fitotecnia Ing. Agr. Mario Alfredo Pérez Ascencio y al director General de Procesos de Graduación de la Facultad de Ciencias Agronómicas Ing. MSc. Elmer Edgardo Corea Guillén. Gracias por su tiempo invertido.

Al personal administrativo y personal docente que participaron de nuestra formación académica.

Muchas Gracias.

DEDICATORIA

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y sobre todo experiencias laboral en la parte de las ciencias agrícolas.

Le doy gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos especialmente Kelvin Méndez por ser parte importante de mi vida y por ayudarme cuando más los he necesitado. A los diferentes ingenieros y licenciados que fueron mis profesores a lo largo de toda la carrera, que me brindaron apoyo, experiencias y compartieron conmigo sus conocimientos, que ahora me ayudan a finalizar esta carrera.

A nuestros asesores y colaboradores por habernos brindado la oportunidad de desarrollar nuestra tesis con todo su apoyo, paciencia, consejos y asesorías.

Por ultimo a todas las personas que me brindaron consejos, apoyo y paciencia a lo largo de este camino, dándome ánimos para seguir con esta carrera y poder culminarla.

Selvin Méndez.

DEDICATORIA

Primeramente a ti mi Dios todo poderoso. Porque durante mi vida me has demostrado que en ti puedo confiar. No me has dejado solo a pesar de ser yo imperfecto, tu misericordia es grande y tu amor inmenso. Gracias por que cuando creí que la situación estaba difícil, me bendijiste con una beca en la universidad; mis palabras se quedan cortas para expresar mi agradecimiento y estoy consciente que cada logro te lo debo a ti mi Dios, sin ti no sería posible esta etapa de mi vida.

A ti madre hermosa. Gracias por tu apoyo incondicional, por confiar en mí, por brindarme con mucho esfuerzo lo que he necesitado, por enseñarme el valor de la vida y hacerme un hombre de bien. Gracias porque desde pequeño me fuiste preparando uno de los mejores regalos que se pueden tener en la vida... «La educación», ahora de joven lo entiendo. Me siento feliz madre, porque esta vez te dedico, no canciones de kindergarten, sino mi tesis de graduación, y tú tienes gran parte en ello.

Gerardo Pardo.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. Cultivo de la anona..... | 3 |
| 2.2. Origen y distribución..... | 3 |
| 2.3. Cosecha | 4 |
| 2.4. Propiedades fisicoquímicas de la Anona (<i>Annona diversifolia</i> Saff.)..... | 4 |
| 2.5. Manejo pos cosecha..... | 5 |
| 2.6. Procesamiento de la anona | 5 |
| 2.7. Mercadeo de la producción de anona..... | 6 |
| 2.8. Información de beneficios | 6 |
| 2.9. Pardeamiento enzimático..... | 6 |
| 2.9.1. Sustratos de pardeamiento enzimático | 7 |
| 2.9.2. Mecanismo general de reacción..... | 9 |
| 2.9.3. Polifenoloxidasas (PPO) | 9 |
| 2.9.4. Estructura de las polifenoloxidasas..... | 9 |
| 2.9.5. Localización de la Polifenoloxidasas en célula vegetal | 10 |
| 2.9.6. El pH y temperatura óptima de actividad..... | 10 |
| 2.9.7. Inhibición de la Polifenoloxidasas | 11 |
| 2.9.8. Agentes químicos antipardeamiento | 11 |
| 2.10. Cinética enzimática..... | 12 |
| 2.11. Mecanismos de inhibición | 13 |
| 2.11.1. Inhibición reversible..... | 13 |
| 2.11.1.1. Inhibidor competitivo | 13 |
| 2.11.1.2. Inhibidor no competitivo:..... | 14 |
| 2.11.1.3. Inhibidor acompetitivo: | 14 |
| 2.11.2. Inhibición irreversible | 14 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 3.1. Descripción del estudio | 15 |
| 3.2. Metodología de campo..... | 16 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2.1. | Recolección de anonas para el estudio | 16 |
| 3.2.2. | Preparación de pulpa | 16 |
| 3.2.3. | Desarrollo de panel sensorial | 17 |
| 3.3. | Metodología de laboratorio | 18 |
| 3.3.1. | Evaluación de la pulpa de anona..... | 18 |
| 3.3.2. | Método para determinar el pH (AOAC 1980)..... | 19 |
| 3.3.3. | Método para determinar la acidez titulable (AOAC 1980) | 19 |
| 3.4. | Análisis sensorial | 20 |
| 3.5. | Cinética enzimática de la polifenoloxidasas de anona | 21 |
| 3.5.1. | Estudio cinético..... | 21 |
| 3.5.2. | Porcentaje de acción antioxidante..... | 24 |
| 3.6. | Metodología estadística | 25 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 4.1. | Análisis Físicoquímico | 26 |
| 4.2. | Determinación de vida estante | 28 |
| 4.3. | Análisis estadístico de la percepción de los descriptores | 30 |
| 4.4. | Cinética de la PPO de Anona (<i>Annona diversifolia</i> Saff.) | 31 |
| 4.4.1. | Comportamiento de PPO de Anona sin antioxidante..... | 31 |
| 4.4.2. | Análisis del comportamiento de PPO de anona en presencia de ácido ascórbico..... | 32 |
| 4.4.3. | Tipo de inhibición del ácido ascórbico sobre la Polifenoloxidasas (PPO).. | 34 |
| 4.4.4. | Porcentaje de acción antioxidante en diferentes concentraciones de Catecol..... | 35 |
| 5. | CONCLUSIONES..... | 37 |
| 6. | RECOMENDACIONES..... | 38 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |
| 8. | ANEXOS | 46 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1 Frecuencia en la que se tomaron medidas de pH, acidez titulable y evaluación organoléptica del puré de anona..... | 19 |
| Cuadro 2 Condiciones para el estudio de la cinética de la polifenoloxidasasa a 14 °C y pH=6.1, empleando AA a 0.5 mM como antioxidante..... | 22 |
| Cuadro 3 Parámetros cinéticos para los tratamientos en estudio..... | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Localización del sitio de extracción de las muestras de anona..... | 16 |
| Figura 2 Ejemplo de gráfica Michaelis-Menten..... | 23 |
| Figura 3 Ejemplo de gráfica Lineweaver-Burk..... | 24 |
| Figura 4 Comportamiento de la acidez titulable de la anona (<i>Annona diversifolia</i>) con la adición de ácido ascórbico, en un periodo de 13 días a una temperatura de 10 a 13 °C. | 26 |
| Figura 5 Comportamiento del pH de la anona (<i>Annona diversifolia</i>) con la adición de ácido ascórbico, en un periodo de 13 días a una temperatura de 10 a 13 °C. | 27 |
| Figura 6 Comportamiento del atributo oscurecimiento durante 11 días a temperatura de 12°C, para determinar vida estante en anona (<i>Annona diversifolia</i>)..... | 28 |
| Figura 7 Comportamiento de los tratamientos a través del tiempo..... | 29 |
| Figura 8 Gráficos de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) para la cinética de Polifenoloxidasas de anona..... | 32 |
| Figura 9 Efecto del ácido ascórbico sobre la quinona formada en la reacción enzimática. Fuente: elaboración propia. | 33 |
| Figura 10 Gráfico Lineweaver-Burk de los tratamientos en estudio..... | 34 |
| Figura 11 Porcentaje de acción antioxidante - Medias ajustadas | 35 |

INDICE DE ANEXOS

CUADROS A

| | |
|--|----|
| Cuadro A- 1 Descripción Taxonómica de la anona rosada..... | 47 |
| Cuadro A- 2 Composición nutricional aproximada, pH y acidez titulable de tres variedades de <i>A. diversifolia</i> Saff | 47 |
| Cuadro A- 3 Contenido de Vitamina C, Polifenoles Totales (TPP), Flavonoides Totales (TF) y Actividad antirradical (IC50) por peso fresco de 3 variedades de <i>A. diversifolia</i> Saff. | 47 |
| Cuadro A- 4 Agentes químicos con acción inhibitoria en el pardeamiento enzimático | 48 |
| Cuadro A- 5 Boleta para perfiles de sabor de Anona | 49 |

FIGURAS A

| | |
|---|----|
| Figura A- 1 Principales sustratos del pardeamiento enzimático. | 50 |
| Figura A- 2 Fases de transformación del pardeamiento enzimático.. | 50 |
| Figura A- 3 Polifenoloxidasas en célula vegetal..... | 50 |
| Figura A- 4 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción enzimática. | 51 |
| Figura A- 5 Representación doble recíproca, gráfico Lineweaver-Burk. | 51 |
| Figura A- 6 Inhibición competitiva. Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles recíprocos. | 51 |
| Figura A- 7 Inhibición no competitiva. Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles recíprocos. | 52 |
| Figura A- 8 Inhibición acompetitiva. Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles recíprocos. | 52 |
| Figura A- 9 Cosecha de frutos. | 52 |
| Figura A- 10 Procesos de desinfección..... | 53 |
| Figura A- 11 Extracción de la pulpa. | 53 |
| Figura A- 12 Homogenización de la pulpa. | 53 |
| Figura A- 13 Preparación de unidades muestrales. | 54 |
| Figura A- 14 Aplicación del Antioxidante..... | 54 |
| Figura A- 15 Almacenamiento de las muestras..... | 54 |
| Figura A- 16 Capacidad para identificar sabores – etapa de selección. | 54 |

| | |
|--|----|
| Figura A- 17 Habilidad para diferenciar escalas de color – etapa de selección. | 55 |
| Figura A- 18 Centrífuga refrigerada marca Thermo® IEC Centra CL3R. | 55 |
| Figura A- 19 Preparación de soluciones buffer, Catecol y ácido ascórbico. | 55 |
| Figura A- 20 Recolección de los datos de absorbancia..... | 55 |
| Figura A- 21 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Oscurecimiento por tratamiento y día. | 56 |
| Figura A- 22 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Oscurecimiento (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico)..... | 56 |
| Figura A- 23 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Oscurecimiento(0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico)..... | 57 |
| Figura A- 24 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Acido por tratamiento y día. | 57 |
| Figura A- 25 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Ácido (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico). | 58 |
| Figura A- 26 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Ácido (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico). | 58 |
| Figura A- 27 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Amargo por tratamiento y día. | 59 |
| Figura A- 28 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Amargo (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico). | 59 |
| Figura A- 29 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Amargo (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico). | 60 |
| Figura A- 30 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Dulce por tratamiento y día. | 60 |
| Figura A- 31 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo dulce (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico)..... | 61 |
| Figura A- 32 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Dulce (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico). | 61 |
| Figura A- 33 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Frutado por tratamiento y día. | 61 |
| Figura A- 34 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Frutado (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico)..... | 61 |
| Figura A- 35 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Frutado (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico). | 61 |

RESUMEN

El estudio “Evaluación del efecto del ácido ascórbico como inhibidor de pardeamiento enzimático en el fruto de anona pulpa rosada (*Annona diversifolia* Saff.) y en la cinética de la polifenoloxidasas” 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 rajar de forma natural; se aplicaron las soluciones antioxidantes de ácido ascórbico a concentraciones de 0.50%, 0.70% y 0.90% (p/v) como tratamientos para el control del pardeamiento enzimático, utilizando un tratamiento como testigo al cual no se aplicó antioxidante y posteriormente fueron almacenados a una temperatura entre 10 a 13 °C. Durante 13 días se realizaron lecturas de pH, acidez titulable y se evaluaron las cualidades organolépticas del puré de anona por medio del análisis sensorial, en donde se determinó que la vida estante del puré de anona sin antioxidante es de 8 días, mientras que los tratamientos con ácido ascórbico a las concentraciones mencionadas anteriormente extienden 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 0.9mM) en la misma, por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm utilizando catecol como sustrato; los parámetros cinéticos obtenidos 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 a una temperatura de 12 ±1 °C y pH de 6.1. Los tratamientos con ácido ascórbico mostraron valores negativos en los K_m y las V_{max} de la polifenoloxidasas (PPO) de anona, indicando que el ácido ascórbico reacciona de manera opuesta a la PPO y que su efecto de reducir las quinonas formadas a los difenoles incoloros originales fue mayor que la acción de la PPO por producir las quinonas. 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 entre las concentraciones de catecol ($F_{7,71}=33.26$; $P<0.0001$), 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: Pardeamiento enzimático, polifenoloxidasas, ácido ascórbico, inhibición, catecol.

1. INTRODUCCIÓN

La anona (*Annona diversifolia* Saff.) en El Salvador es un fruto que muchos gustan por su dulce sabor, por tanto tiene un alto potencial para ampliar su comercialización. Sin embargo, existe poca investigación en cuanto a su manejo poscosecha y su desarrollo comercial se ha visto estancado desde hace varios años por haber mínimos esfuerzos en prácticas agronómicas y de poscosecha. Cuando su cáscara se raja en el árbol (índice de cosecha) la anona sufre el pardeamiento en la pulpa, al igual que otras frutas, siendo esto considerado un defecto de calidad que ha impedido su desarrollo comercial.

Mayer, citado por Sallés (2007) menciona que las frutas y vegetales son afectadas por el fenómeno enzimático de pardeamiento durante el crecimiento, recogida, almacenamiento y procesado, siendo un problema de primera magnitud en la industria alimentaria y se reconoce como una de las principales causas de pérdida de la calidad y valor comercial. Según Corse (1964) y Whitaker (1976), este pardeamiento ocurre por la acción de una enzima (o múltiples enzimas) que oxidan orto-difenoles a orto-quinonas; esto causa que exista una polimerización que da origen a compuestos coloreados oscuros conocidos como melanoidinas normalmente de color café marrón.

Estudios realizados por Smock y Neubert (1950) determinaron que la Polifenoloxidasa es la principal responsable del pardeamiento enzimático en manzana. Luego de 28 años de haberse publicado este estudio, Paschoalino (1978) llegó a la misma conclusión, pero en este caso con tallo de palmito. También Bouchilloux (1962), Adams y Blundstone (1971) y Eskin (1971) coinciden en que la principal enzima responsable de las reacciones de oscurecimiento es la polifenoloxidasa, con la diferencia que estos autores experimentaron en diversos sustratos animal, vegetal y mariscos.

La Universidad Nacional del Noreste de Argentina publicó un estudio elaborado por Avallone C. et al. (2000), en el que evaluó el comportamiento de la polifenoloxidasa en papaya (*Carica papaya* L.), determinó que los tratamientos de escaldado a una temperatura de 87 °C y la utilización de aditivos como sacarosa a una concentración indicada, junto a ácido cítrico, bisulfito de sodio y sorbato de potasio ayudan a inhibir el pardeamiento enzimático producido por la enzima antes mencionada.

También Pérez (2003) en su tesis doctoral evaluó nuevamente el método de temperatura y antioxidantes en pera variedad Blanquilla (*Pyrus communis*); en el primer método nuevamente trabajaron a 87 °C, también determinó que los mejores aditivos que se ayudan a

inhibir la aparición de esta enzima son el ácido cítrico y el ácido ascórbico obteniéndose resultados favorables para la inhibición del oscurecimiento de las frutas. Los efectos inhibitorios enzimáticos han sido estudiados en diversos frutos tropicales como banano, aguacate, papayo, níspero, entre otras frutas tropicales, pero en anona (*Annona diversifolia* Saff.) aún no se registran estudios.

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 polifenoloxidasas 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.

Para ello, se evaluó el efecto del ácido ascórbico como inhibidor de pardeamiento enzimático del fruto de anona pulpa rosada (*Annona diversifolia* Saff.) como también la cinética de la polifenoloxidasas. En una primera etapa, por medio del análisis sensorial se determinó qué concentración de ácido ascórbico permite que la anona pulpa rosada (*Annona diversifolia* Saff.) mantenga su color por más tiempo, como también durante este tiempo de almacenamiento se tomaron lecturas de pH y acidez titulable en la pulpa. Como segunda etapa, se determinaron los parámetros cinéticos de la Polifenoloxidasas sin presencia de inhibidores, se estudió su comportamiento frente al ácido ascórbico y luego se calculó el porcentaje de acción antioxidante del ácido ascórbico en diferentes concentraciones de catecol.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultivo de la anona

La familia Anonáceas está compuesta aproximadamente por 2,300 especies. Alrededor de 300 a 400 especies producen frutos comestibles de formas muy variadas. La palabra anona se deriva del latín, y significa “la cosecha anual”. En nuestro país se encuentran 9 especies diferentes de anonas, siendo las más comunes y de mayor importancia económica la Anona de Castilla o Anona Rosada (*Annona diversifolia* Saff.), la Chirimoya (*Annona cherimola*), la Sincuya (*Annona purpurea*) y la Guanábana (*Annona muricata*) (Cruz Pineda 2003).

A pesar que en El Salvador muchas personas gustan de la Anona (*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 (Irigoyen 2004). Su clasificación taxonómica se presenta en el cuadro A-1.

La anona se considera de gran importancia económica para los pueblos donde prospera, ya que es una fuente de ingresos adicionales para las familias recolectoras en la época de producción, una vez al año produce frutos y solo en un periodo corto de tiempo (Zabala et. al.1997). El fruto tiene una longitud de aproximadamente 12 cm, la pulpa puede ser de color blanca, rosada o rojiza. Presenta un aroma típico y su sabor puede variar de simple a dulce. El tipo dulce es el preferido y alcanza mejor precio en el mercado (Avilán y Leal 1989).

Botánicamente la anona se clasifica como una baya colectiva de forma elipsoidal u ovoide, con cáscara gruesa y coriácea, de color verde a rojo ceniza y contiene numerosas semillas (Cruz y Parada 2001); posee una apariencia polvosa, al igual que la parte inferior de las hojas. Su peso oscila entre 200 gramos y 2 kilogramos por unidad, dependiendo del clima, suelo y manejo (Irigoyen 2004).

2.2. Origen y distribución

Originaria de Mesoamérica, región ubicada entre el oeste de Centroamérica, el centro y sureste de México, encontrándose silvestre en las laderas de las montañas, especialmente en el pie de monte de las cordilleras costeras del Pacífico de México, Guatemala y El Salvador, aunque prospera muy bien en regiones medias y altas. Además, se ha introducido recientemente a Florida y California (EE.UU.), Colombia, Filipinas y otros países de Centroamérica y el Caribe (Cruz y Deras 1999).

Se adapta a diversas regiones de El Salvador como las denominadas franjas o regiones anoneras: Tacuba-Cara Sucia-Guaymango (Ahuachapán); El Congo-El Resbaladero-El Conacaste-Ciudad Arce-San Pablo Tacachico (Santa Ana-La Libertad); Mizata-Chiltiupán-La Libertad-Asuchío (La Libertad), Berlín-Mercedes Umaña-Estanzuelas (Usulután), Tonacatepeque-Guazapa (San Salvador); Ilobasco-Jutiapa-El Guayabo (Cabañas). Todas ellas caracterizadas por poseer árboles silvestres o cultivados en patios y áreas marginales, sin manejo técnico y con énfasis en la recolección de frutos (Irigoyen 2004).

2.3. Cosecha

La cosecha se realiza cuando los frutos se abren en el árbol, lo que es un índice de maduración, comúnmente los frutos rajados se cortan y se ponen a madurar, envueltos en papel periódico u otro material similar. La recolección de la fruta se debe realizar a mano, directamente del árbol (Irigoyen 2004).

El rendimiento de los árboles de anona ha sido calculado con base en proyecciones: al tercer año producen 30 frutos, 40 al cuarto, al sexto año del establecimiento del cultivo se obtienen 60 frutos por árbol, y a partir del séptimo año, la productividad puede ser de 70 a 80 frutos, con 75 frutos como promedio (Irigoyen 2004). Sin embargo, algunos materiales silvestres presentan datos excepcionales y son altamente productores de frutos de muy buena calidad.

2.4. Propiedades fisicoquímicas de la Anona (*Annona diversifolia* Saff.)

Salas-Coronado et al. (2010) realizaron un estudio sobre la composición química, el color, y la actividad antioxidante de tres variedades de *Annona diversifolia* Saff. (Anona blanca, rosada y rosado intenso). Determinaron los valores de fibra, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, cenizas, minerales, pH, acidez titulable, entre otros datos bromatológicos. Los resultados mostraron que las tres variedades estudiadas podrían ser consideradas como fuentes importantes de azúcares, potasio, zinc (Cuadro A- 2).

Asimismo, Salas-Coronado et al. (2010) llevaron a cabo un estudio vitro en función de la vitamina C, fenoles totales, flavonoides totales, y la actividad de eliminación de radicales como se muestra en el cuadro A-3. Se observó una fuerte correlación linear inversa entre polifenoles totales y la actividad de eliminación de radicales ($r=-1.00$).

En el cuadro A-3 se presentan datos de la capacidad antioxidante de las tres variedades de *A. diversifolia*. Se observa que la variedad de anona blanca tuvo la mayor concentración de vitamina C con 2.38 ± 0.18 mg/100 g. Las variedades blancas y rosadas intensas presentaron la mayor concentración de Polifenoles Totales (TPP) con 170.16 ± 4.44 y 170.88 ± 2.19 mg GAE/100 g. En cuanto al contenido de Flavonoides Totales (TF), la variedad blanca mostró el mayor contenido con 152.045 ± 5.39 mg EC/100 g (Salas-Coronado et al. 2010).

2.5. Manejo pos cosecha

Almacenamiento de fruta fresca: esta alternativa consiste en recolectar los frutos maduros, colocándolos sobre papel periódico para protegerlos de magullamiento y a la vez ventilarlos. La fruta se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm límite máximo), para eliminar hongos y bacterias que puedan estar en la pulpa expuesta al ambiente, por la abertura que estos frutos presentan. Posteriormente se almacena a temperatura ambiente. Por lo general, la vida útil de la anona, después de cortada, es de 4 a 5 días, con este método el tiempo de vida se puede duplicar. Se debe tener cuidado en la cosecha y el transporte porque ambos inciden en la vida en anaquel del producto (Irigoyen 2004).

Anona congelada: la fruta se lava con una solución de hipoclorito de sodio, para luego quitarle la cáscara. La fruta se tiene 10 minutos en inmersión, en solución de *Bisulfito de Sodio o Metasulfito de sodio* (0.45 g/lit), para estabilizar el color, reducir la oxidación y evitar el ennegrecimiento de la pulpa. La fruta se empaca en bolsas plásticas y se coloca en refrigeradora a temperaturas de 7 a 10 °C (Irigoyen 2004). Según AromatecA (s.f.) la FDA en 1986 revocó el estado GRAS de los Bisulfitos, determinando que la utilización de estos aditivos es un riesgo potencial para la salud de los consumidores sensibles a los sulfitos.

2.6. Procesamiento de la anona

Pulpa de Anona esterilizada: Producto que se obtiene a partir del colado de la pulpa, adicionando azúcar y gelatina sin sabor. Se somete a cocción hasta alcanzar una concentración de 21 a 24 grados Brix y un pH de 3.5. Con este procedimiento se pretende conservar la pulpa por un tiempo mayor al logrado con las alternativas de almacenamiento tradicional con la adición de un lavado de cloro y la refrigeración entre 7 y 10 °C, que oscila entre los 8 y los 20 días (Cruz Pineda 2003).

Mermelada de anona: Producto que se obtiene a partir de la mezcla de pulpa, azúcar, gelatina sin sabor y ácido cítrico. Se somete a cocción hasta alcanzar una concentración de 65 grados Brix. Tanto la pulpa esterilizada como la mermelada, pueden tener una vida útil de 1 a 2 años al ser envasadas en vidrio y almacenarse en un lugar fresco y ventilado (Irigoyen 2004).

2.7. Mercadeo de la producción de anona

La anona posee un mercado estacional amplio, para comercializar a nivel nacional, alcanzando los mejores precios en los meses previos (julio) y posteriores (octubre) a la cosecha propiamente dicha, que va de agosto a septiembre. Para acceder al mercado internacional, existen restricciones de exportación a raíz de la presencia de las moscas de la fruta y otros barrenadores. En la actualidad no es posible la exportación en fresco a Estados Unidos. (Irigoyen, 2004), aunque cifras de este mismo año señalan valores considerables de \$40 mil dólares en forma congelada, al igual que otras frutas criollas que han evadido estas restricciones (como zapote, nance, arrayán, jocote), al ingresar como pulpa o volúmenes congelados a temperaturas inferiores a los 0° Celsius (MINEC 2005).

2.8. Información de beneficios

La anona tiene diversos beneficios, entre ellos, algunos medicinales: En México hasta poco más de 20 años, las hojas frescas de la anona se colocaban en la frente para disminuir los dolores de cabeza y calenturas, entre otros. En El Salvador se ha usado para afecciones de la piel y granos. Así mismo se ha elaborado pulpa concentrada para la elaboración de yogurt, paletas, sorbetes, que podrían dar valor agregado a la fruta. Las semillas tienen propiedades o usos como insecticidas y acción repelente contra piojos y otras plagas de cultivos. La madera de las Anonáceas, no tiene importancia comercial, no obstante la madera de sincuya se emplea en construcción, y las de la anona colorada o de Castilla y guanaba, han servido para elaborar puyas y yugos para bueyes. Gran parte de la madera de las anonas es usada como leña de regular calidad (Irigoyen 2004).

2.9. Pardeamiento enzimático

El reconocimiento de la naturaleza enzimática de este tipo de pardeamiento en ciertos frutos debería de atribuirse probablemente a Lindet. Sin embargo, fue Onslow quien demostró, en 1920, que el pardeamiento enzimático de los tejidos vegetales en contacto con el aire se

debe a la presencia de derivados del orto-dihidroxifenol, como el catecol, el ácido protocatecuico y el ácido cafeico, así como de ésteres del ácido hidroxigálico con el ácido cafeico, y el ácido clorogénico que se encuentra difundido en muchos frutos, y especialmente en las papas y plátanos (Hernández Valdez 2009).

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 transforman en estructuras poliméricas poco aclaradas, por lo general con coloraciones oscuras o pardas. A pesar del nombre genérico de “pardeamiento”, los colores formados son muy variables, marrones, rojizos o negros, dependiendo del alimento y de las condiciones del proceso (Calvo, M. s.f.).

La enzima que cataliza el pardeamiento tiene varios nombres comunes: fenolasa, fenoloxidasa, tirosinasa, polifenoloxidasa, catecolasa, la cual se encuentra presente en tejidos animales y vegetales (Herrera Ramírez 2003).

En los animales, la enzima generalmente se denomina tirosinasa, debido a que la tirosina es uno de sus sustratos más comunes. El aminoácido tirosina es hidroxilado por la enzima a 3,4-dihidroxifenilalanina; y por posterior oxidación, al compuesto indol-5,6-quinona. Esta enzima cumple una función importante en la biosíntesis de melanina, que da color a la piel, ojos, cabello y otros (Herrera Ramírez 2003).

En las plantas, la enzima es mayormente conocida como polifenoloxidasa (PPO), esta enzima, es una de las más estudiadas en la industria de los alimentos ya que es la responsable de las reacciones de pardeamiento enzimático en frutas y verduras, siendo comercialmente indeseable, ya que modifica las propiedades sensoriales, nutricionales y en general de calidad que perjudica su comercialización (Guerrero 2009). Este proceso ocurre en algunas frutas frescas y hortalizas cuando son peladas, golpeadas o cortadas (Suárez 2009).

2.9.1. Sustratos de pardeamiento enzimático

Según Herrera Ramírez (2003) los sustratos en los que actúa la polifenoloxidasa son compuestos fenólicos (monofenoles u orto-difenoles) presentes en los tejidos vegetales, como el aminoácido tirosina, la catequina, el ácido cafeico, el ácido clorogénico y otros.

Los más importantes son catequinas (3-hidroxi flavonas), ésteres de ácido cinámico, el 5-O-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico) el cual es el sustrato más encontrado en la naturaleza, el 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que es el producto de la hidroxilación de tirosina; y la Tirosina la cual siendo un fenol y al mismo tiempo un aminoácido constituyente de proteínas, se encuentra en cada tejido de las plantas (figura A- 1) (Trejo y Bustamante s.f.).

Según Bello Gutiérrez (2000) los sustratos que pueden ser objeto de las reacciones propias del pardeamiento enzimático hay que buscarlos entre los principales componentes fenólicos de los alimentos de origen vegetal:

- El orto-difenol y sus derivados, aunque no sus compuestos metilados: el pirocatecol, pero no el guayacol; el ácido caféico, pero no el ácido ferúlico; el ácido protocatéquico.
- Los compuestos derivados del aminoácido L-Tirosina: la L-Dopa o 3,4-dihidroxi-fenilalanina, existente en la papa, y la dopamina o 3,4-dihidroxi-feniletilamina, que es el sustrato principal del pardeamiento de los plátanos.
- Los ácidos orgánicos que incluyen en sus estructuras anillos aromáticos: el ácido gálico, que puede tomar parte de algunos taninos hidrosolubles, y el ácido clorogénico presente en los granos de cafés, manzanas, papas, que con vestigios de cationes de hierro puede dar lugar a pigmentos negro azulados.
- Los compuestos flavonoides, que pueden encontrarse bajo las formas más diversas como: antocianósidos y antocianidoles, leucocianidol, flavonoles y flavononas.
- Las ligninas, que son polímeros fenólicos responsables de las estructuras rígidas de muchos vegetales.
- Los taninos, unos derivados pirogálicos y otros condensados catéquicos, que reaccionan con proteínas y que bajo sus formas oxidadas aportadas por el lúpulo, participan en la turbidez de la cerveza, o pueden formar compuestos pigmentados pardos.

2.9.2. Mecanismo general de reacción

Según Bello Gutiérrez (2000) el sistema presenta una doble actividad capaz de catalizar dos tipos de reacciones (figura A-2):

- El paso de monofenoles a orto-difenoles mediante una actividad cresolasa, que implica una hidroxilación.
- La conversión de orto-difenoles a orto-quinonas, a través de una actividad catecolasa, que implica una oxidación.

Las quinonas pueden reaccionar con grupos nucleofílicos presentes en las proteínas, como algunos aminoácidos, grupos fenólicos, y otros, generando pigmentos oscuros, de estructura desconocida y denominados en forma genérica como “melanoidinas” o melaninas (Herrera Ramírez 2003).

2.9.3. Polifenoloxidasas (PPO)

La enzima responsable del pardeamiento enzimático recibe el nombre de polifenoloxidasas, fenolasa o tirosinasa, en este último caso especialmente cuando se hace referencia a animales, ya que en ellos la tirosina es el principal sustrato (Hernández Valdez 2009). La Comisión de Enzimas (EC-Enzyme Commission) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), clasifica a la PPO como EC 1.10.3.1 (Denoya 2012). Generalmente se admite que todos estos términos incluyen las enzimas que tienen la capacidad de oxidar compuestos fenólicos a orto-quinonas. Su nombre sistemático corresponde al de orto-difenol oxígeno oxidoreductasa (Bello Gutiérrez 2000).

2.9.4. Estructura de las polifenoloxidasas

La polifenoloxidasas (PPO), es una proteína de cobre que actúa en los compuestos fenólicos, causando su oxidación y polimerización con el consecuente desarrollo de un color café (García 2006). La característica estructural más importante de estas enzimas es la presencia en su centro activo de dos átomos de cobre. En su entorno se sitúan una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes en su actividad, para la unión de los sustratos (Calvo s.f).

Para que la enzima actúe sobre el sustrato fenólico, el Cu^{++2} ha de encontrarse reducido a Cu^{+1} , estado en el que la enzima puede ligar oxígeno. El cobre, situado en el centro activo de la enzima, es esencial para la inactividad de la polifenoloxidasas y su acomplejamiento da lugar a la inhibición de la misma (Song y Chichester 1967; Pérez 2003).

2.9.5. Localización de la Polifenoloxidasas en célula vegetal

Según López-Nicolás (2012) la Polifenoloxidasas (PPO) se encuentra generalmente en los cloroplastos de las células vegetales, la cual a través de dos pasos, convierte los monofenoles presentes en las vacuolas de dichas células en difenoles, y posteriormente, oxida estos difenoles a orto-quinonas (figura A- 3). Finalmente, y a través de una reacción química, estas quinonas se convierten en manchas oscuras (melaninas) que comúnmente se observan en manzanas, papas y peras. En circunstancias normales los polifenoles no tienen contacto con la enzima y la reacción no se produce a velocidad apreciable, pero si por un impacto u otro procedimiento similar (al pelar con un cuchillo) se produce la ruptura de los compartimentos en que ambos productos se alojan, éstos se ponen en contacto y la producción de quinonas comienza (López-Nicolás 2012).

2.9.6. El pH y temperatura óptima de actividad

La mayoría de las polifenoloxidasas presentan un máximo de actividad en el rango de pH 5.0 a 7.0, el cual varía dependiendo de la enzima, como también el sustrato (Valero 1993). Según Bello Gutiérrez (2000), el rango de preferencia de estas enzimas es entre 6.0-6.5, aunque su pH óptimo no se encuentra bien definido, además hace mención que el sistema se inactiva cuando el pH del medio alcanza las zonas ácidas inferiores a 3.0.

En cuanto a la temperatura óptima de actividad, ha sido mucho menos investigada que el pH óptimo; los datos disponibles indican que la temperatura óptima depende de los mismos factores que depende el pH óptimo (Trejo y Bustamante s.f.). La UNAD (s.f.) menciona que se pueden requerir temperaturas hasta de 100°C durante 2 a 10 minutos para desnaturalizar dicho biocatalizador.

Estudios realizados por Gasull y Becerra (2006) muestran que la enzima PPO de pera muestra una actividad máxima a 25°C , mientras que para manzana de 30°C . También se han reportado temperaturas óptimas de durazno (Jen y Kahler 1974), uva (Cash et al. 1976), ciruela (Siddiq et al. 1992) y níspero (Dincer 2002) en 20, 25, 37 y 35°C respectivamente.

2.9.7. Inhibición de la Polifenoloxidasas

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.

La actividad de las enzimas polifenoloxidasas presentes en frutas y vegetales puede ser inhibida por calentamiento o por remoción de alguno de sus componentes necesarios: O_2 , enzima, Cu^{++2} o sustrato (Guerrero Beltrán et al. 2005, Pilco 2014). Agentes reductores, antioxidantes e inhibidores enzimáticos previene el pardeamiento reduciendo químicamente las ortoquinonas a difenoles coloreados, inhibiendo la actividad de la enzima por disminución del pH, o quelando el Cu^{++2} en el alimento (Gasull y Becerra 2006).

2.9.8. Agentes químicos antipardeamiento

Antes de que la FDA revocara su estado GRAS en 1986 debido a su riesgo potencial a la salud expuesto por consumidores sensibles, los sulfitos se utilizaban ampliamente para controlar tanto el pardeamiento enzimático como el no enzimático. Debido a que se prohibió su aplicación en frutas y verduras para consumo en crudo, se pensó en otros químicos para prevenir el pardeamiento enzimático (AromatecA s.f.).

Se utilizan varios tipos de químicos para el control del pardeamiento. Algunos tipos actúan directamente como inhibidores de PPO, otros propician un medio inadecuado para el desarrollo de la reacción de oscurecimiento, y otros reaccionan con los productos de la reacción de PPO antes de que lleguen a formar los pigmentos oscuros (AromatecA s.f.).

En el cuadro A-4 se presenta un resumen de algunos agentes químicos con acción inhibitoria en el pardeamiento enzimático.

Vegetales especialmente propensos a sufrir pardeamiento por oxidación química, como manzanas, peras, duraznos, damascos, ciruelas y plátanos entre las frutas, y papas, espárragos, zanahorias entre las hortalizas, deben mantenerse, inmediatamente después de cortadas o peladas, en agua adicionada de 0.1-0.2 % p/v de ácido ascórbico y de 0.2% p/v de ácido cítrico (Schmidt y Pennacchiotti 2001).

Se aplica el bloqueo de los hidróxilos fenólicos por adición de complejantes con el cobre de la PPO, como el ácido cítrico (0.2%) y boratos (0.2% + 0.01% SO_2). También la cisteína y otros dadores de SH se unen a los fenoles, dando complejos incoloros, previa reducción de las quinonas (Schmidt y Pennacchiotti 2001).

2.10. Cinética enzimática

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima.

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato (Gago 2008).

En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{\max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos (Gago 2008).

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante (Velázquez 2010). Si se representa la velocidad de reacción (v_0) frente a la concentración de sustrato $[S]$ obtenemos una gráfica como la de la figura A- 4, conocida como gráfico de Michaelis-Menten.

La figura A- 4 muestra que a una concentración de sustrato baja, la velocidad de la reacción v_0 es casi proporcional a la concentración del sustrato y la reacción por lo tanto, es aproximadamente de primer orden con respecto al mismo. Sin embargo, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentración de sustrato; en esta zona el orden de la reacción es mixto. Con un aumento posterior de la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones de sustrato la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, se dice que la enzima se halla saturada con su sustrato y su velocidad es máxima (Velázquez 2010).

La teoría de Michaelis-Menten supone que la enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima-sustrato ES; a continuación este último se disocia en una segunda etapa, para formar enzima libre y producto P. Esto se expresa con la siguiente ecuación:



El gráfico de Michaelis-Menten puede transformarse en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales. Una de ellas es tomando los recíprocos de ambos miembros del gráfico, presentando $1/v_0$ frente a $1/[S]$ obteniendo una línea recta; a esto se le conoce como gráfico Lineweaver-Burk. La pendiente de la recta es K_m/v_{max} , y la intersección sobre el eje $1/v_0$ es $1/v_{max}$; la intersección sobre el eje $1/[S]$ es $-1/K_m$ (figura A- 5). Tal representación doble-recíproca tiene la ventaja que permite una determinación mucho más exacta del valor de V_{max} , como también puede proporcionar información valiosa acerca de la inhibición enzimática (Velázquez 2010).

2.11. Mecanismos de inhibición

Se conocen dos tipos principales de inhibición: la reversible y a la irreversible. 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 (Gago 2008).

2.11.1. Inhibición reversible

Los distintos modelos de inhibición reversible implican la unión no covalente del inhibidor con la enzima, pero difieren en los mecanismos por medio de los cuales reducen la actividad enzimática y en la forma en que afectan a la cinética de la reacción. Entre ellos están la inhibición competitiva, la acompetitiva y la no competitiva (Velázquez 2010).

2.11.1.1. Inhibidor competitivo

Es una sustancia similar en estructura al sustrato, con quien compite por el sitio activo de la enzima (UHU s.f.).

Cuando se realizan distintos estudios a varias concentraciones de inhibidor, obtenemos, mediante la representación de dobles inversos, distintas rectas que se cortan en el mismo

punto (para $X=0$), indicando que la V_{max} no se altera, pero la K_m (y por lo tanto la afinidad) aparentemente sí, pues existen varios puntos de corte para $y=0$, por lo tanto aparentemente varias K_m , que además van aumentando con la concentración del Inhibidor (figura A- 6) (Gago 2008).

2.11.1.2. Inhibidor no competitivo:

Puede combinarse tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato, sin afectar al sitio activo de la enzima (UHU s.f.).

Al no unirse el inhibidor al sitio activo, no se afecta la afinidad de la enzima por el sustrato y en este caso la K_m no se altera y la V_{max} disminuye, como puede observarse en la representación de dobles inversos (figura A- 7), el punto de corte de las rectas ahora está sobre el eje X, (cuando $y=0$), mientras que hay distintos punto de corte con el eje Y, como se aprecia la V_{max} disminuye con el inhibidor (UHU s.f.).

2.11.1.3. Inhibidor acompetitivo:

Reacciona con la enzima en un punto distinto al centro activo, pero sólo en el caso de que ésta esté unida al sustrato formando el complejo ES; de esta forma impide que la enzima desarrolle su actividad catalítica (UHU s.f.).

Tanto la V_{max} como la K_m se alteran en la misma proporción, esto se manifiesta en la representación de dobles inversos como rectas paralelas y por lo tanto con la misma pendiente (figura A- 8). Se observa cómo se produce, una disminución de la V_{max} y curiosamente, también, una disminución aparente del K_m (Velázquez 2010).

2.11.2. Inhibición irreversible

El inhibidor se une covalentemente a la enzima y la inactiva de manera irreversible. Casi todos los inhibidores irreversibles son sustancias tóxicas naturales o sintéticas (UHU s.f.).

Se trata de sustancias que reaccionan con algún grupo funcional importante para la catálisis, bloqueándolo e impidiendo que la enzima desarrolle su actividad. En muchos casos la interacción se produce a través del sitio activo, impidiendo de manera irreversible que el sustrato ocupe su lugar; tal es el caso del gas Sarín, que inhibe irreversiblemente la acetilcolinesterasa, enzimas implicadas en la transmisión del impulso nervioso, al competir con su sustrato, la acetilcolina (un neurotransmisor) y la inhalación del gas causa parálisis rápida de las funciones vitales (UHU s.f.).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. 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. Después de dos días en proceso de maduración se trasladaron al laboratorio de Protección Vegetal II, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. Se le extrajo la pulpa de las diferentes 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 las soluciones antioxidantes de ácido ascórbico a concentraciones de 0.50%, 0.70% y 0.90% (p/v) como tratamientos para el control del pardeamiento enzimático, utilizando como testigo un tratamiento al cual no se aplicó antioxidante. Posteriormente, se almacenó el puré de anona por 13 días a una temperatura entre 10 a 13 °C; durante el almacén, se evaluaron las características organolépticas de la pulpa de anona y se realizaron lecturas de pH, acidez titulable.

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 conocido por su acción antioxidante en la actividad de la PPO; para ello, se utilizaron tres concentraciones de ácido ascórbico (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.

3.2. Metodología de campo

3.2.1. Recolección de anonas para el estudio

Los frutos se cosecharon en 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 (figura 1).



Figura 1 Localización del sitio de extracción de las muestras de anona.

La recolección de los frutos se realizó de forma manual, utilizando un cosechador para no dañar el tejido o cáscara del fruto. El índice de cosecha que se utilizó es cuando el fruto empieza a abrirse, de lo contrario el fruto no tiene su madurez fisiológica ni la maduración adecuada (figura A- 9). Posteriormente se verificó mediante una inspección visual las condiciones del fruto, luego se desinfectó el fruto utilizando una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm (Irigoyen 2004). Se envolvieron en papel de empaque y se colocaron en jabs plásticas para su transporte a los laboratorios de estudio, evitando en gran manera las magulladuras en el transporte. Finalmente, se dejaron envueltas en papel y en reposo por un periodo de 72 horas a temperatura ambiente para que completaran su proceso de maduración.

3.2.2. Preparación de pulpa

Recepción de materia prima: como materia prima se utilizó anona de pulpa rosada (*Annona diversifolia* Saff.) en estado maduro y fresco, con tamaño y forma uniforme.

Lavado: las anonas se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a 200 ppm para eliminar todo tipo de microorganismos patógenos adquiridos en campo, transporte y manipulación del fruto hacia su destino final (figura A- 10).

Pelado: se eliminó en su totalidad la cáscara de la anona lo más rápido posible para evitar el pardeamiento enzimático. Esto se realizó de manera manual con la ayuda de cuchillos desinfectados, guantes y mascarillas; cuidando de no presionar ni lastimar los frutos; finalmente, se eliminaron las semillas (figura A- 11).

Despulpado: En esta etapa se homogenizó la pulpa en licuadora previamente refrigerada, para hacer un producto pastoso y uniforme (figura A- 12). Junto a ello se le agregó sorbato de potasio ($C_6H_7KO_2$) al 0.2 % p/v grado alimenticio como conservante (Menjivar y Vanegas 2014).

Envasado: la pulpa se colocó en tarros de boca ancha con capacidad de 20 gramos. Se depositó en ellos la cantidad de 15 gramos para que los panelistas dieran su percepción de los descriptores establecidos. Cada contenedor se identificó según el tratamiento evaluado (figura A- 13).

Aplicación de antioxidantes: en la superficie de la pulpa de anona de cada muestra, se aplicó un promedio de 0.8 ml de solución antioxidante mediante el uso de un atomizador, de manera de cubrir la superficie para observar su comportamiento (figura A- 14).

Almacenamiento en refrigeración: la pulpa se almacenó en condiciones de refrigeración a temperaturas de 10 a 13 °C durante 13 días, tiempo en el que se realizaron lecturas de pH, acidez titulable y la evaluación de las propiedades organolépticas de la pulpa (figura A- 15).

3.2.3. Desarrollo de panel sensorial

Para la correcta conformación del panel sensorial, fue necesario que las personas se sometieran a las siguientes etapas:

Etapas de preselección: se seleccionaron de forma al azar 8 mujeres y 8 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.

Etapa de selección: se tomaron en cuenta características que son fundamentales para un juez, como lo son las habilidades de poder diferenciar y reconocer en una o varias muestras de sabores y colores diversos; también se verificó la disponibilidad para asistir a las sesiones programadas, interés por las pruebas que se realizan y el desempeño del panelista al presentar consistencia en sus respuestas. Para ello, las personas fueron sometidas al proceso de selección, el cual 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 (figura A- 16)
- ✓ Prueba 3: Habilidad para diferenciar escalas de color.
- ✓ Prueba 4: fue réplica de la prueba 3, para diferenciar escalas de color (figura A- 17).

Etapa de entrenamiento:

Luego de pasar los filtros establecidos, se seleccionó un grupo de 10 personas que destacaron según sus respuestas en cuanto a hábitos de consumo, disponibilidad de tiempo y sus resultados en las pruebas de percepción de sabores y capacidad de diferenciar escalas de colores. Ya que es importante que el panelista seleccionado, tenga una sensibilidad tal que al evaluar varias veces una muestra, los resultados obtenidos sean siempre los mismos. Para el entrenamiento los panelistas degustaron anona rosada y anona blanca (*Annona diversifolia* Saff.) para que conocieran las características organolépticas que tiene cada variedad; además, por consenso determinaron cada descriptor de sabor y color para la elaboración del perfil de anona.

3.3. Metodología de laboratorio

3.3.1. Evaluación de la pulpa de anona

McGregor (1989) menciona que la Atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) tiene un peso de 284-454 g y la Cherimoya (*Annona cherimola*) de 250-600 g, la temperatura de almacenaje es de 13 °C y HR de 85-90% para ambas especies, la Atemoya tiene una duración de 4-6 semanas y la Cherimoya de 2-4 semanas bajo estas condiciones. También Valle (2012) señala que la temperatura para Saramuyo (*Annona squamosa*) y Atemoya no debe ser inferior a 13 °C porque sufren daño por frío. Estas tres especies del género *Annona* son similares a la *Annona diversifolia* Saff. pero no rajan su cáscara, por lo que se estima que *A. diversifolia* Saff. tiene menor vida anaquel.

Tomando estos datos como parámetros, la pulpa de Anona (*Annona diversifolia* Saff.) se sometió a una temperatura de almacenamiento de 10-13 °C durante 13 días, en los que se tomaron medidas de pH y acidez titulable por duplicado, evaluando a la vez sus características organolépticas. La frecuencia de dichos estudios fue mayor a medida se acercó al tiempo en que se pronosticó que sería notorio el pardeamiento en el puré (cuadro 1), la cual se conoce como frecuencia Gácula. Este ensayo se repitió 4 veces.

Cuadro 1 Frecuencia en la que se tomaron medidas de pH, acidez titulable y evaluación organoléptica del puré de anona (*Annona diversifolia* Saff.).

| Tratam. | DÍAS DE ALMACENAMIENTO | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| T ₀ | * | | | | * | | | | * | | | * | | * |
| T ₁ | * | | | | * | | | | * | | | * | | * |
| T ₂ | * | | | | * | | | | * | | | * | | * |
| T ₃ | * | | | | * | | | | * | | | * | | * |

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

3.3.2. 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.

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

La pulpa se extrajo de frutos que permanecieron refrigerados como mínimo 24 horas. En la titulación, se utilizó el indicador azul de bromotimol para evitar confusión con el color rosado de la muestra de anona, como podría ser el caso de la fenoltaleína; según Nielsen (2010) el azul de bromotimol tiene un cambio de color de amarillo a azul en el rango de pH 6.0-7.6, siendo usualmente su punto final un verde distintivo. Asimismo, es utilizado algunas veces como un indicador alternativo en situaciones de baja acidez.

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 (0.064 para ácido cítrico)
- ✓ **A**: Gramos o ml de muestra

3.4. Análisis sensorial

El panel sensorial estuvo compuesto por 10 personas entrenadas, siendo la mitad mujeres y la otra mitad hombres. Los panelistas cumplían con los requisitos básicos establecidos para la formación del panel: haber sido seleccionados mediante las pruebas de percepción de sabores, pruebas para diferenciar escalas de colores; como también, estar entrenados con escalas de colores y características organolépticas de la anona.

Durante el almacenamiento del puré de anona se ejecutaron pruebas para la generación de perfiles organolépticos de cada tratamiento, por medio de una evaluación visual del color y de algunos descriptores de sabor de la anona. Para esta prueba se utilizó una boleta (cuadro A-5) que presentaba 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). Además se incluyó la evaluación general del puré, pidiendo la opinión del panel para saber si la muestra es apta para consumo o no.

3.5. Cinética enzimática de la polifenoloxidasa de anona

Se extrajo la polifenoloxidasa de anonas (*Annona diversifolia* Saff.) y se analizó utilizando Catecol como sustrato. En el progreso de la reacción se registró la formación del producto inicial de la oxidación del Catecol utilizando la absorbancia a 420 nm. El análisis se hizo para generar datos que permitieran calcular V_{max} y K_m , y así conocer los efectos de las soluciones antioxidantes en estudio sobre la rapidez de reacción.

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, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 horas antes de obtener el extracto acuoso de la Polifenoloxidasa.

Extracción de la enzima Polifenoloxidasa:

- 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 pesó 20 g de pulpa en una balanza analítica y se mezcló con 100 ml de búfer fluoruro de sodio 0.1 M (0.1M de Na_2HPO_4 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 (figura A- 18).
- 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 mm Ø) para eliminar la turbidez del extracto (figura A- 19-A). El extracto se mantuvo en refrigerador común a 4°C.

3.5.1. Estudio cinético

- El estudio cinético se realizó mediante espectrofotometría, analizando el efecto inhibitorio de tres soluciones de ácido ascórbico (AA) sobre la Polifenoloxidasa en dicha reacción. Las soluciones fueron las siguientes AA a 0.5 mM, AA a 0.7 mM, AA a 0.9 mM y AA a 0.00 mM. En el cuadro 2 se presenta un ejemplo de cómo se evaluó cada solución de inhibidor.

- 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, pH=6.1 (figura A- 19-B) como el ejemplo del cuadro 2. Todas las medidas de velocidad inicial se tomaron por duplicado a 14 °C.
- Se tuvo un blanco con 2.5 ml del regulador fosfato de sodio (0.2M Na₂HPO₄, pH=6.1) y 0.5 ml de extracto enzimático.

Cuadro 2 Condiciones para el estudio de la cinética de la polifenoloxidasas de *Annona diversifolia* Saff. a 14 °C y pH=6.1, empleando AA a 0.5 mM como antioxidante.

| Tubo | Concentración Catecol (mM) en buffer fosfato de sodio 0.2M | Catecol (ml)* | Extracto enzimático (ml) |
|------|--|---------------|--------------------------|
| 1 | 1.0 | 2.5 | 0.5 |
| 2 | 2.0 | 2.5 | 0.5 |
| 3 | 3.0 | 2.5 | 0.5 |
| 4 | 4.0 | 2.5 | 0.5 |
| 5 | 5.0 | 2.5 | 0.5 |
| 6 | 6.0 | 2.5 | 0.5 |
| 7 | 7.0 | 2.5 | 0.5 |
| 8 | 8.0 | 2.5 | 0.5 |

AA a 0.5 mM en solución de Catecol.

Se preparó el espectrofotómetro (marca Thermo® Spectronic Genesys 20) a 420 nm, llevando a cero de absorbancia con la solución antes mencionada 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 (figura A- 20).

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
- \sum : coeficiente de absorbancia 3.450 mmol⁻¹cm⁻¹ (Sánchez et al. 2011).
- **b**: es la longitud de la trayectoria luminosa (1 cm)
- **t**: tiempo (un minuto)

Con las velocidades de reacción obtenidas a las diferentes concentraciones de sustrato, se elaboró una tabla que registra velocidad de reacción (V), el recíproco de la velocidad (1/V), concentración del sustrato [S] y el recíproco del sustrato 1/[S].

Se determinó el comportamiento de reacción de la polifenoloxidasasa, elaborando la gráfica de la cinética de Michaelis-Menten, el cual refleja la velocidad de la reacción contra la concentración del sustrato, formando una hipérbola como lo describe la siguiente ecuación:

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Dónde: V_{max} es la rapidez máxima que se alcanza cuando todos los sitios activos de una enzima están saturados con sustrato. K_m es igual a la concentración de sustrato a la cual la rapidez de reacción es la mitad de su valor máximo (Miller 2003). Ver figura 2:

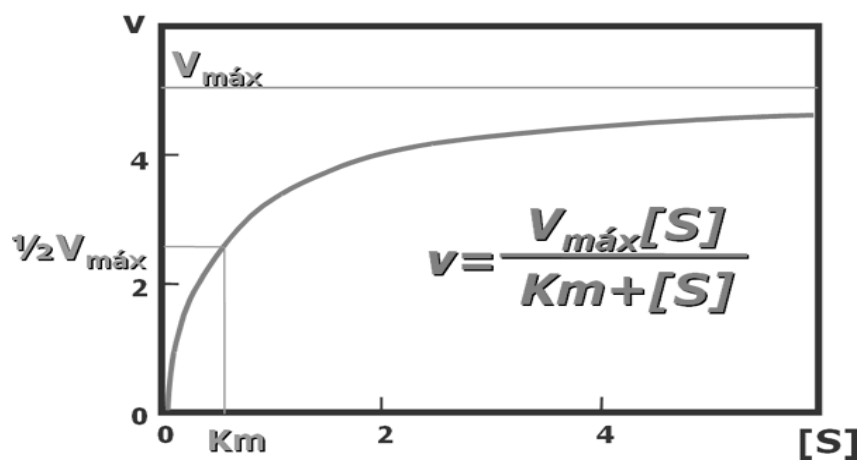


Figura 2 Ejemplo de gráfica Michaelis-Menten

Se debe conocer el K_m para medir la velocidad que es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y para determinar esta constante y la V_{max} se usa la gráfica de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos (figura 3), donde se trazan en una línea el recíproco de la velocidad frente al recíproco de la concentración de sustrato (Nielsen citado por Menjívar 2014).

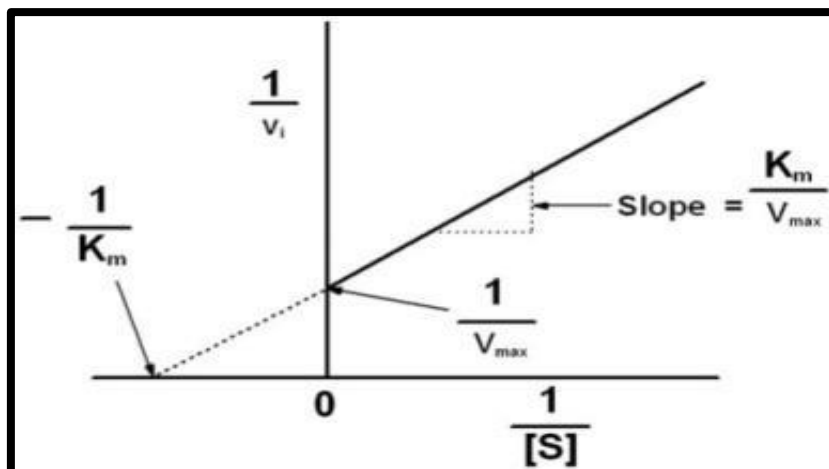


Figura 3 Ejemplo de gráfica Lineweaver-Burk

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]}$$

3.5.2. 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 polifenoloxidasasa 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.

3.6. 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).

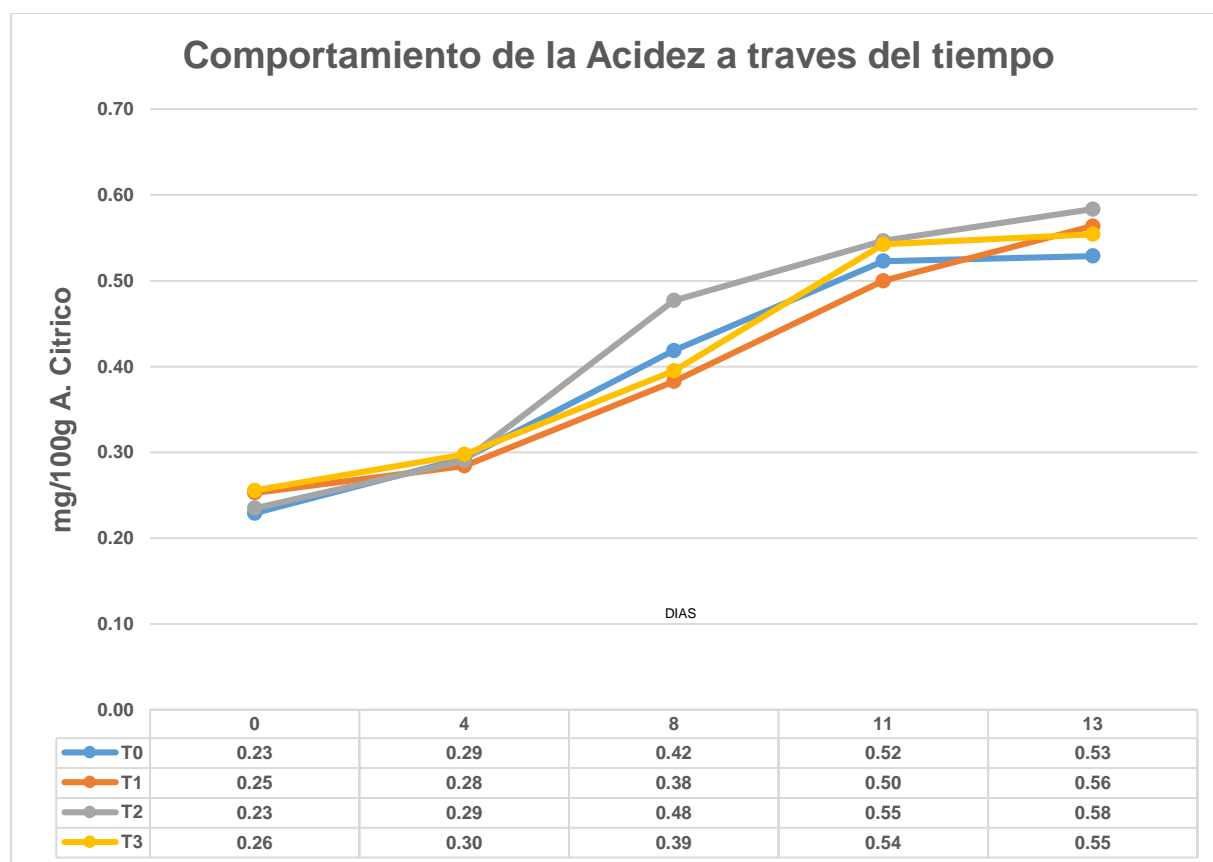
La inhibición de la enzima polifenoloxidasasa fue evaluada aplicando un modelo lineal mixto en el porcentaje de inhibición enzimática, tomando como factor aleatorio los frutos de los cuales se obtuvo la pulpa, a un nivel de significancia del 5%. El modelo fue ajustado utilizando el programa InfoStat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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis Fisicoquímico

a) Acidez Titulable:

Los ácidos tienen un importante papel en el sabor del fruto. Los valores de acidez presentaron un comportamiento 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 afectado por la adición de ácido ascórbico aplicados según se observa en la figura 4.



T0= pulpa sin antioxidante.

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

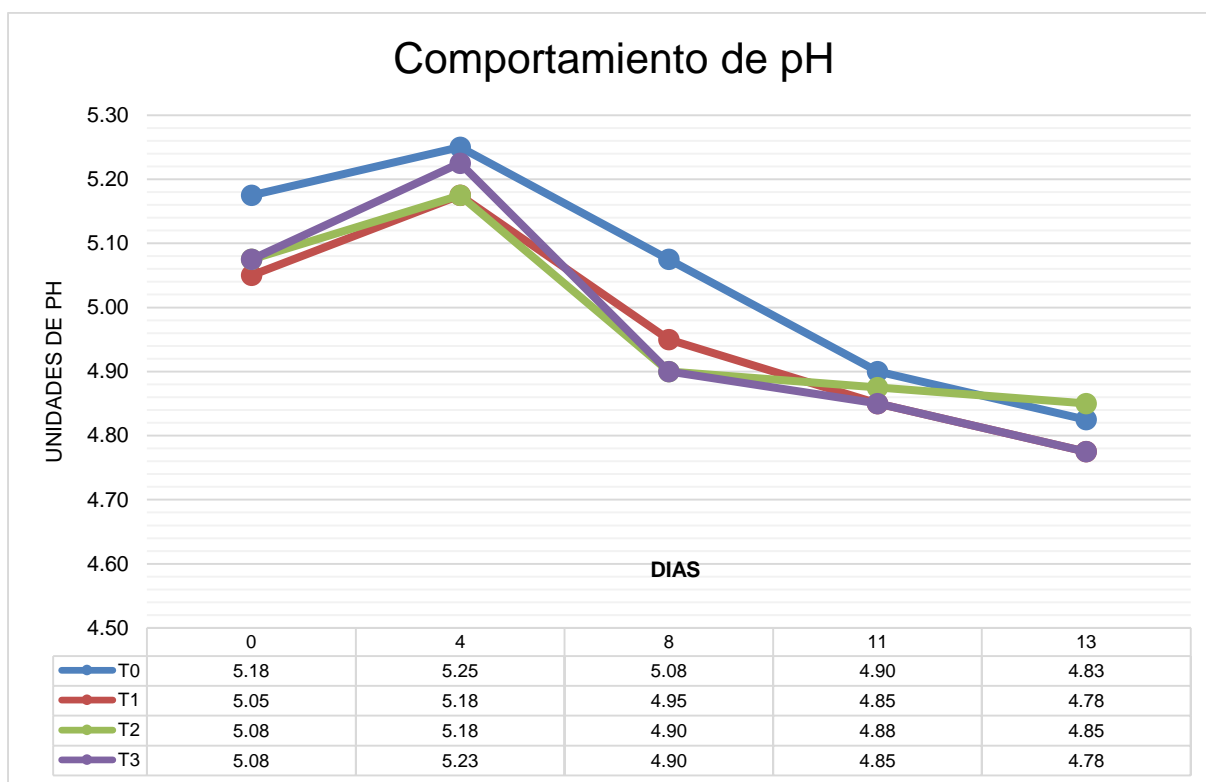
T2= pulpa con solución AA al 0.70% p/v

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

Figura 4 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 10 a 13 °C.

b) Comportamiento del pH:

El pH en pulpa de anona rosada se comportó a la baja (figura 5), presentado un rango que va desde 5.05 hasta 4.78 a los 13 días de evaluación, a una temperatura entre 10 a 13 °C. Los tratamientos que contienen ácido ascórbico (0.5%,0.7% y 0.9% p/v) presentaron un comportamiento similar entre ellos. Por tanto, 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

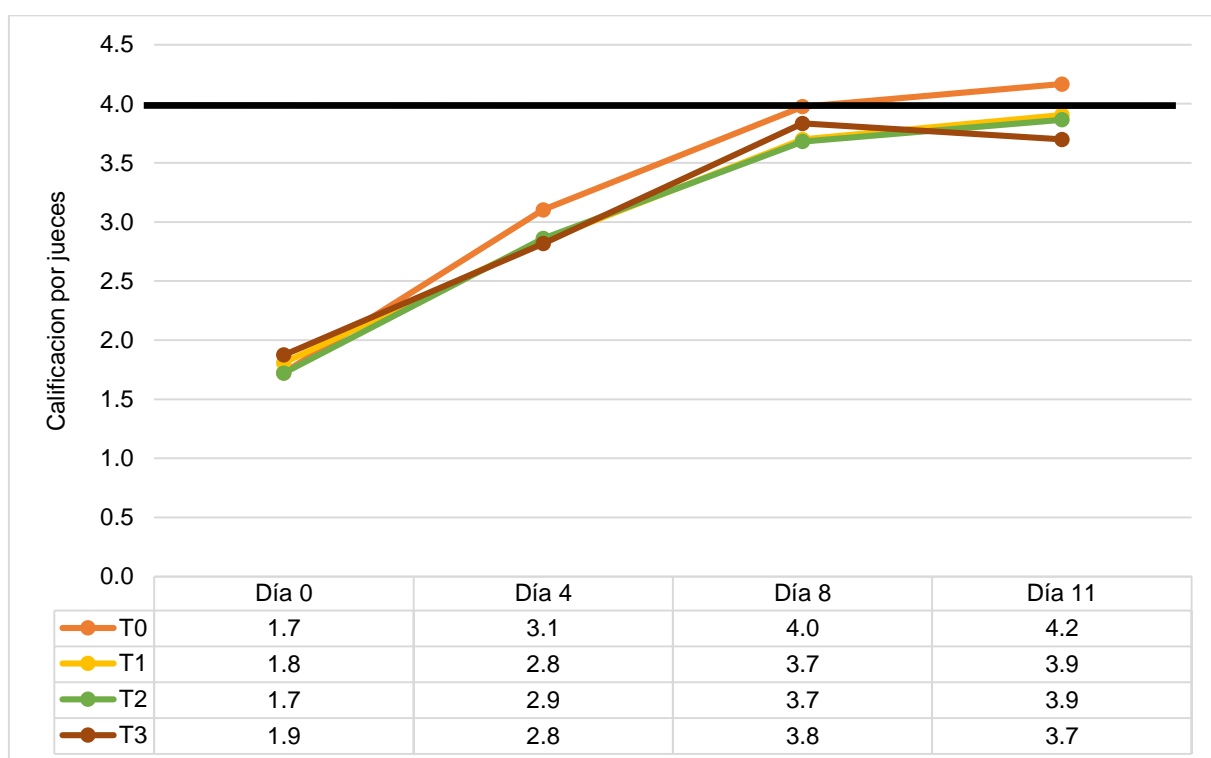
T3= pulpa con solución AA al 0.90% p/v

Figura 5 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 10 a 13 °C.

El ácido ascórbico no actuó como acidulante a las concentraciones utilizadas, por tanto no presentó alteraciones en las características fisicoquímicas del puré de anona.

4.2. Determinación de vida estante

Mediante el instrumento de evaluación (cuadro A- 5) 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.



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

En la figura 6 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 levemente las calificaciones más altas a comparación de los tratamientos con ácido ascórbico (T1, T2 y T3) durante los 11 días.

También se determinaron los perfiles organolépticos del depuré de anona, de los cuales se muestran a continuación los resultados correspondientes a la percepción de las cuatro repeticiones realizadas a lo largo de la evaluación.

En la figura 7 se presenta el comportamiento de cada uno de los tratamientos durante un periodo de 11 días a temperatura de 12°C, en puré anona (*Annona diversifolia* Saff.) evaluado por panelistas entrenados.

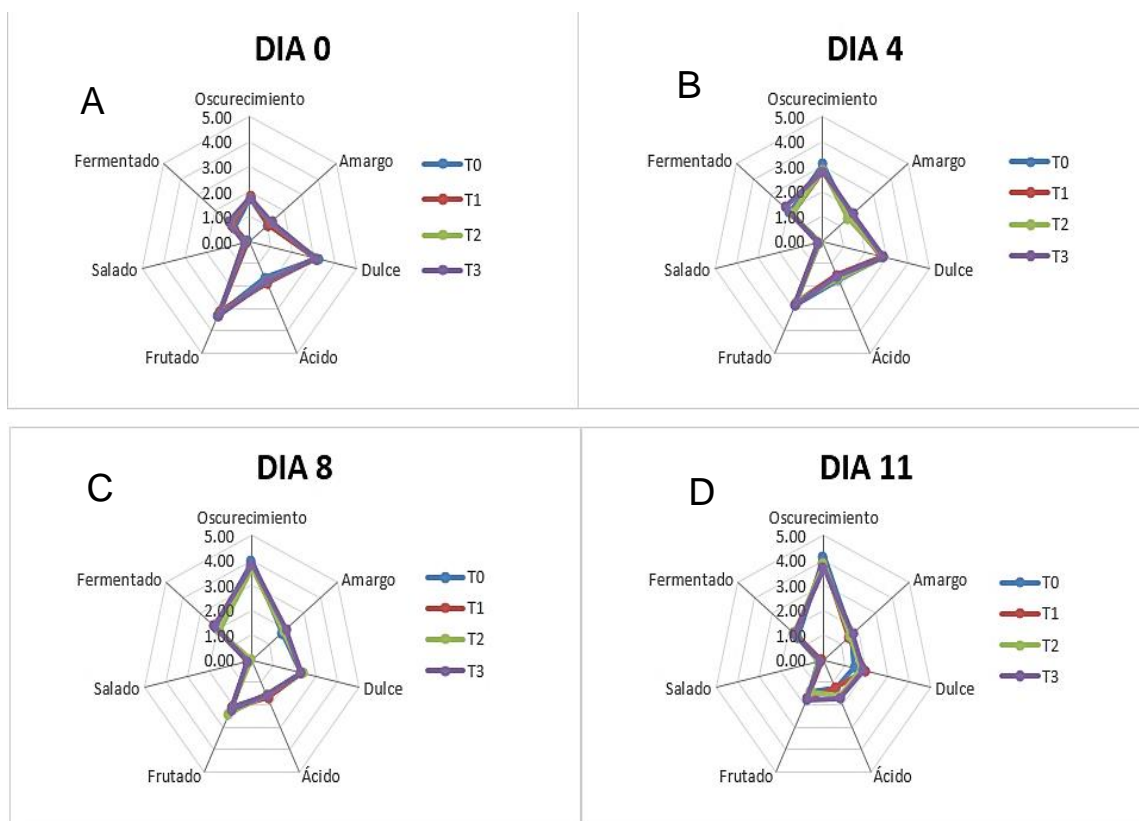


Figura 7 Comportamiento de los tratamientos a través del tiempo.

Según los criterios emitidos por los 10 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: oscurecimiento, 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 precepción en las muestras, son los descriptores fermentado y salado (figura 7).

La figura 7 presenta una similitud entre los perfiles del puré de anona de los 4 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.

4.3. Análisis estadístico de la percepción de los descriptores

- **Oscurecimiento**

El análisis sensorial realizado al puré de anona, no mostró diferencias entre tratamientos como resultado de la adición de soluciones de ácido ascórbico a diferentes concentraciones ($\chi^2_3=5.52$, $P=0.1373$) según la figura A- 27-A. Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en cuanto al oscurecimiento fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=317.83$, $P=1.37e^{-68}$) mostrado en la figura A- 27-B. La interacción de tratamientos y días no presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=5.79$, $P=0.7611$) para el atributo “oscurecimiento” como se muestran en las figura A- 22 y figura A- 23.

- **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 ($\chi^2_3=10.72$, $P=0.013$) figura A- 24-A. Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en acidez de las muestras fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=9.70$, $P=0.0212$) figura A- 24-B. La interacción de tratamientos y días presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=30.3$, $P=0.0003$) para el atributo “ácido” como se muestran en las figura A- 25 y figura A- 26.

- **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 ($\chi^2_3=5.15$, $P=0.1611$) figura A- 27-A. Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en amargo fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=37.23$, $P=4.10e^{-08}$) figura A- 27-B. La interacción de tratamientos y días no presentaron diferencias significativas ($\chi^2_9=2.74$, $P=0.9736$) para el atributo “amargo” como se muestran en las figura A- 28 y figura A- 29.

- **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 ($\chi^2_3=0.056$, $P=0.81$) según figura A- 30-A. Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en cuanto al descriptor dulce fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=46.40$, $P=9.620e^{-12}$) figura A- 30-B. 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” como se muestran en las figura A- 31 y figura A-38.

- **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 ($\chi^2_3=1.18$, $P=0.7567$) figura A- 33-A. Conforme avanzaron los días después de la preparación de las muestras, las diferencias en el descriptor frutado fueron significativamente diferentes ($\chi^2_3=256.19$, $P=3.00e^{-55}$) figura A- 33-B. 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” como se muestran en las figura A- 34 y figura A- 35.

4.4. Cinética de la PPO de Anona (*Annona diversifolia* Saff.)

4.4.1. Comportamiento de PPO de Anona sin antioxidante

Las absorbancias de la oxidación del Catecol (sustrato) con Polifenoloxidasas 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 8-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 8-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 et al. 2011) y en “rúcula” *Eruca sativa* (Landi 2013) 3.77 mM/L y 4.16 mM/L respectivamente.

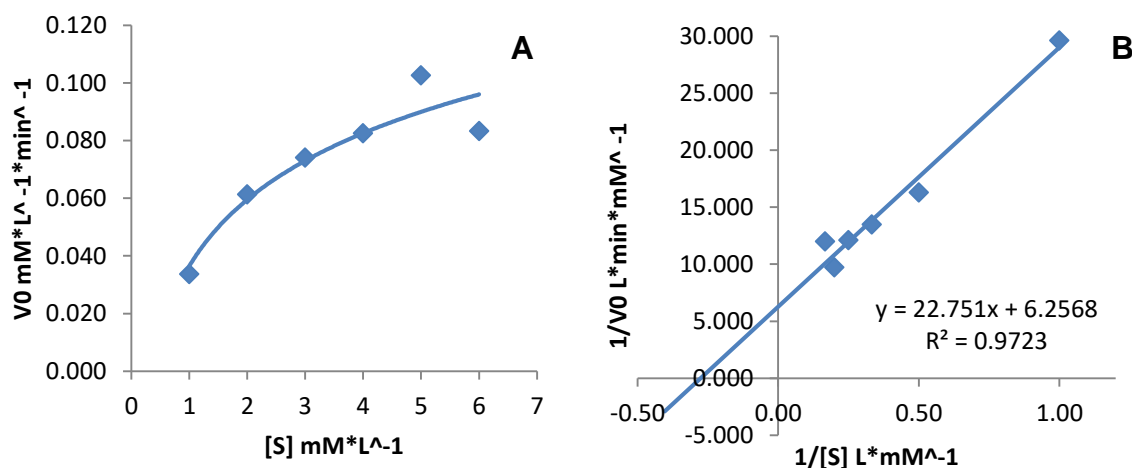


Figura 8 Gráficos de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) para la cinética de Polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1.

4.4.2. Análisis del comportamiento de PPO 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 3).

Cuadro 3 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 9), 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}.

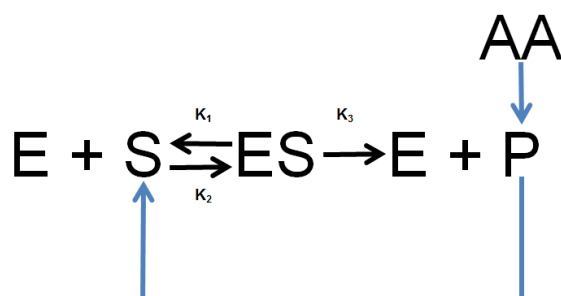


Figura 9 Efecto del ácido ascórbico sobre la quinona formada en la reacción enzimática. Fuente: elaboración propia.

4.4.3. 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 10), 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 $X=0$).

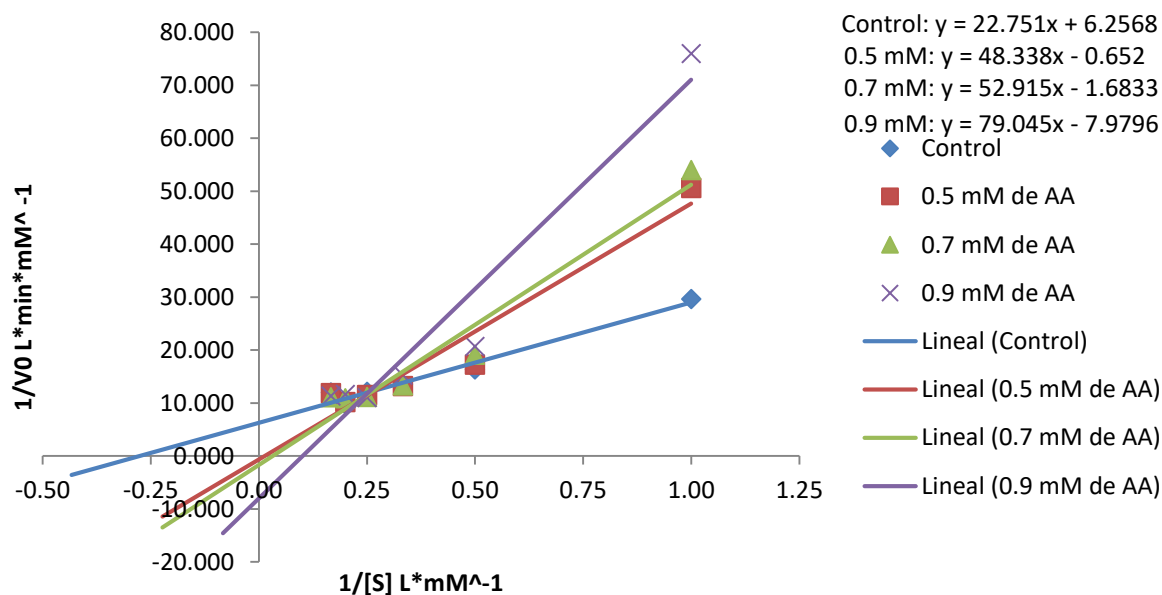


Figura 10 Gráfico Lineweaver-Burk de los tratamientos de ácido ascórbico sobre la polifenoloxidasas de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1.

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 el gráfico Lineweaver-Burk, las líneas rectas de los tratamientos evaluados en este estudio (0.5mM, 0.7mM y 0.9mM de AA) 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.

4.4.4. 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 11 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.

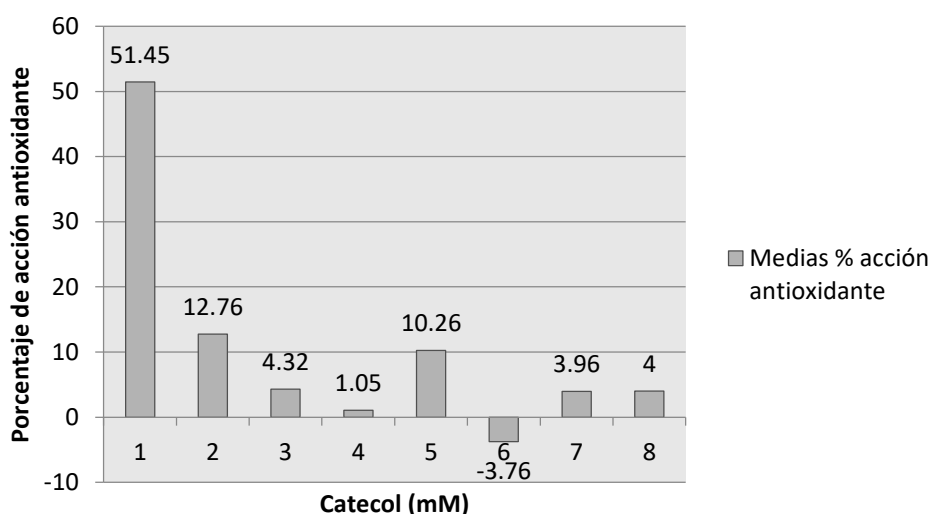


Figura 11 Porcentaje de acción antioxidante del ácido ascórbico sobre la polifenoloxidasasa de anona (*Annona diversifolia* Saff.) a 14 °C y pH=6.1

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.

5. 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 3 días su vida estante a comparación del puré de anona sin ácido ascórbico.
- Las cualidades organolépticas del puré de anona no fueron afectadas, ya que los tres tratamientos con ácido ascórbico presentaron perfiles organolépticos similares al tratamiento testigo. Asimismo, 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 hacia la polifenoloxidasasa. De modo que es posible obtener resultados satisfactorios en la inactivación de la enzima con estas tres concentraciones.

6. 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.
- Ejecutar un análisis sensorial de puré de anona utilizando ácido ascórbico a concentraciones más altas que las evaluadas en este estudio.
- Predecir la vida estante de anona empleando diferentes temperaturas 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.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, JB; Blundestone. 1971. Canned fruits other than citrus. In: HULME A.C. 2 ed. The Biochemistry of fruits and Thier Products. London, UK, vol 2, p.507-541.

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 polifenoloxidasa del aguacate (Pesea americana 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.

Aromateca, GT. s.f. Control de Pardeamiento Enzimático (en línea). Estazuela, GT, Lehmann. Consultado 10 oct. 2015. Disponible en: http://aromateca.com/main/index.php?option=com_content&task=view&id=80&Itemid=2

Avallone, C; Cravzov, AL; Montenegro, SB; Pellizzari, E. 2000. Estudio de la actividad de polifenoloxidasa y proxidas en (Carica papaya L.) mínimamente procesada (en línea). Chaco, AR, Facultad de Agroindustrias – UNNE. Consultado 1 de Abr. 2016. Disponible en: http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_020.pdf

Avilan, L; Leal, F. 1989. Manual de Fruticultura, cultivo y producción. Editorial América, C.A., Chacaito, Caracas, VE, p 326-331.

Aydemir, T. 2004. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from artichoke (Cynaria sclymus 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.

Buchilloux, S. 1962. Enzymatic browning reaction. In: RONECKLES, V.C., ed. Plants Phenoics and Their Significance, Montreal, Imperial tabacco Co., 1-14.

Calvo, M. s.f. Bioquímica de los alimentos: tirosinasa (en línea). Consultado 26 set. 2015. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>

Cash, J.N.; Sistrunk W.A y Stutte C.A. 1976. Characteristics of Concord grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. *Journal of Food Science* 41(6):1398 - 1402.

Chong, C. 2009. Propiedades de polifenoloxidasas obtenidas 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/>.

Corse, J. 1964. The enzymatic browning of fruits and vegetables. In: RONECKLES, V. C., ed. Phenolic in Normal and Diseased fruit and vegetables. Montreal, CA, Imperial Tobacco Co., p 41-62.

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>

Cruz, P; Deras, F. H. 1999. Diagnóstico ecogeográfico de especies de Anonáceas en El Salvador. San Andrés, La Libertad. MAG-CENTA. P 4-6.

Cruz, P. E; Parada, P. F. 2001. El cultivo de la Anona en El Salvador. San Andrés, La Libertad, SV, MAG-CENTA 16 p.

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.

Dincer, K. 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry* p 1-7.

Eskin, NA; Henderson RJ. 1971. Biochemistry of foods. London, UK, Academic Press. 239p.

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/ivsgago/fundaments%20de%20biocatalis3%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf>

García, M. 2006. Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano Gros michel en diferentes estados de maduración. Vitae 13(2): 0121-4004.

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.

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

Guerrero Beltrán, J.; Swanson, B.; Barbosa Cánovas, G. 2005. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. LWT. 38: 625-639.

Hernández Valdez, C. 2009. Acción y efectos de la polifenoloxidasas en alimentos. Tesis Ing. Quím. Veracruz, MX, Universidad Veracruzana. 72 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.

Jen, J.; Kahler, K. 1974. Characterization of polyphenol oxidase in peaches grown in the Southeast. HortScience 9:590-591.

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.

López-Nicolás, J. 2012. El antioxidante que se pasó al lado oscuro con la ayuda de un plátano (en línea). *Scientia*. Consultado 10 oct. 2015. Disponible en: <http://scientiablog.com/2012/01/23/el-antioxidante-que-se-paso-al-lado-oscuro-con-la-ayuda-de-un-platano/>

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>

McGregor, B. 1989. *Tropical Products: Transport Handbook*. Washington. DC., US. USDA. Agriculture Handbook No. 668. 148 p.

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)

MINEC (Ministerio de Economía, SV) 2005. Exportaciones de frutas congeladas crecen 589% en 2004 (en línea). Santa Tecla, SV. Consultado: 6 de May. 2016. Disponible: <http://servicios.minec.gob.sv/default.asp?ACT=5&content=323&id=62&mnu=62>

Nielsen, S. 2010. *Food Analysis*. West Lafayette, US, Springer. 602 p.

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

Paschoalino, JE. 1978. Aspectos sobre el escurecimiento de palmito durante o procesamiento. Boletín do Instituto de Tecnología de Alimentos. Campinas, BR, p 175-18

Pérez, E. 2003. Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad blanquilla) mínimamente procesada. Tesis Dr. Valencia, ES, Universidad Politécnica de Valencia. 256 p.

Pilco, A. 2014. Pardeamiento Enzimático (en línea). Consultado 1 de oct. 2015. Disponible en: http://alimentos6173.blogspot.com/2014/07/pardeamiento-enzimatico_8.html

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/>.

Salas-Coronado, R; Julián-Loeza, A; Santos-Sánchez, N. 2010. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. Elsevier 34(2): 1262–1268.

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.

Sánchez, Y; Sánchez, J; Vázquez, R; Andrade, R. 2011. Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*. Revista Mexicana de Micología 34: 31-42.

Schmidt, H; Pennacchiotti, I. 2001. Las enzimas en los alimentos: su importancia en la química y la tecnología de los alimentos. s.l. Biblioteca Digital Universidad de Chile. s.p.

Siddiq, L; Smith, R; Barrientos, W. 1992. Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. Journal of Food Science 57:1177-1179.

Smock, RM; Neubert, AM. 1950. Apples And Apples Products (en línea). Minnesota, USA. Consultado 3 de Abr. 2016 Disponible: [https://?id=enzimatic_browning_apple&q=Smock+y+Neubert+\(1950&dq=Smock+y+Neubert+\(1950&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjNgtnXmIbOAhUHqx4KHR9XBlwQ6AEIjAB.pdf](https://?id=enzimatic_browning_apple&q=Smock+y+Neubert+(1950&dq=Smock+y+Neubert+(1950&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjNgtnXmIbOAhUHqx4KHR9XBlwQ6AEIjAB.pdf)

Song P; Chichester C. 1967. Kinetic behavior and mechanism of inhibitor in the Maillard reaction: Kinetic behavior of the inhibition in the reaction between Dglucose and glycine. Journal Food Science 32(1):96-106.

Suárez. 2009. Frutas y verduras: pardeamiento enzimático (en línea). Consultado 28 set. 2015. Disponible en: <http://controldecalidadenfrutasysterduras.blogspot.com/2009/08/pardeamiento-enzimatico.html>

Trejo, A; Bustamante, S. s.f. Procesos Tecnológicos de Frutos y Vegetales: determinación de enzimas relacionadas con la maduración de productos vegetales. Cuautitlán, MX, UNAM. 14 p.

UHU (Universidad de Huelva, ES). s.f. Bioquímica. Enzimas II (en línea). Consultado 8 ene. 2017. Disponible en: http://www.uhu.es/08007/documentos%20de%20texto/apuntes/2005/pdf/tema_08_enzimas_2.pdf

UNAD (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, CO). s.f. Reacciones de pardeamiento: pardeamiento enzimático (en línea). Consultado 8 oct. 2015. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301203/301203/leccin_38_pardeamiento_enzimatico.html

Valero, E. 1993. Caracterización Cinética de la Polifenol Oxidasa de Uva Airen: Efecto de Inhibidores. Tesis Dr. Cien. Quím. Ciudad Real, ES, Universidad de Castilla-La Mancha. 146p.

Valle. 2012. Comportamiento postcosecha de frutos de ilama (*Annona diversifolia*) en madurez comestible almacenados en atmósfera modificada. Revista fitotecnia mexicana 35(5): 0187-7380.

Velázquez, M. 2010. Termodinámica, Cinética y Enzimas (en línea). Consultado 8 ene. 2017. Disponible en: <http://www.bioquimica.dogsleep.net/Teoria/archivos/Unidad41.pdf>

Whitaker L. 1976. Enzymatic browning reaction In: RONECKLES, V.C. PlantsPhenoics and Their Significance (en línea). Montreal, CAN. Consultado 17 de Abr. 2016. Disponible: http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_020.pdf

Zavala H., F.; García V., E., Muratalla L., A.; Chávez F., S. 1997. Diferenciación de yemas de *Annona diversifolia* Saff., en la región de tierra caliente, Estado de Guerrero. En: Memoria. Congreso Internacional de Anonáceas, Chapingo, MX. P. 31-32

8. ANEXOS

CUADROS A

Cuadro A- 1 Descripción Taxonómica de la anona rosada

| Taxonomía de la Anona | |
|---------------------------|--|
| REINO: | Plantae |
| CLASE: | Dicotiledóneas |
| ORDEN: | Ranales |
| SUB ORDEN: | Magnolinales |
| FAMILIA: | Anonáceas |
| GÉNERO: | Annona |
| ESPECIE: | diversifolia |
| NOMBRE CIENTÍFICO: | Annona diversifolia Safford |
| NOMBRES COMUNES: | Anona rosada, anona roja, anona caribe, anona blanca (El Salvador); ilama, ilamazapotl (Zapote de las viejas en náhuatl), izlama. (México); anona, anón, papause, corazón de buey (Guatemala). |

Fuente: Irigoyen 2004

Cuadro A- 2 Composición nutricional aproximada, pH y acidez titulable de tres variedades de *A. diversifolia* Saff

| Variedad | K | Zn | Azúcares | | | Acidez Titulable | *pH |
|----------------|------------------|------------------|------------|-----------|-----------|------------------|------------|
| | | | Sacarosa | Glucosa | Fructosa | | |
| Blanca | 347.80± 8.75a | 0.15± 0.004 a | 7.59±0.006 | 3.19±0.06 | 4.09±0.23 | 0.16±0.004a | 4.99±0.02c |
| Rosada | 355.95± 7.11a | 0.15± 0.005b | 6.79±0.32 | 2.48±0.06 | 3.01±0.06 | 0.17±0.001b | 5.19±0.05b |
| Rosado intenso | 347.40± 10a | 0.10± 0.005c | 9.33±0.31 | 3.54±0.08 | 4.81±0.09 | 0.34±0.002c | 4.79±0.06b |

Composición proximal en g/100 g y acidez titulable en ácido cítrico mg/100 g. Promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican que los medios de combinación son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo con el método de rangos múltiples de Duncan; Composición de azúcar en g/100g. Todos los valores son significativamente diferentes.

Fuente: Salas-Coronado et al. 2010

Cuadro A- 3 Contenido de Vitamina C, Polifenoles Totales (TPP), Flavonoides Totales (TF) y Actividad antirradical (IC50) por peso fresco de 3 variedades de *A. diversifolia* Saff.

| Variedad | Vitamina C (mg/100g) | TPP (mg GAE/100 g) | TF (mg EC/100 g) | Act. Antirrad. IC ₅₀ (µg/ml) |
|----------------|----------------------|--------------------|------------------|---|
| Blanca | 2.38±0.18a | 170.16±4.44a | 152.045±5.39a | 1714.99±61.82a |
| Rosada | 1.64±0.01b | 129.27±132b | 107.41±5.15b | 1998.19±63.14b |
| Rosado intenso | 1.51±0.25b | 170.88±2.19a | 142.56±2.55a | 1707.07±47.42a |

Cuadro A- 4 Agentes químicos con acción inhibitoria en el pardeamiento enzimático

| Inhibidor | Efecto/acción | Defectos | Comentarios | Concentraciones analizadas |
|-----------------------------------|---|---|--|--|
| Acidulantes | | | | |
| Ácido cítrico | Posible doble efecto: baja el pH y quelación al Cu del lugar activo del PPO. | | Teóricamente se logra la inhibición del oscurecimiento bajando el pH 2 unidades bajo el pH óptimo del PPO. | 0.5-2% (p/p) |
| Reductores (antioxidantes) | | | | |
| Ácido ascórbico | Reducción de o-quinonas a difenoles decolorados. | Efecto temporal: el ácido ascórbico también se consume. Penetración insuficiente dentro del tejido del alimento. | | 0.5-1% (p/p) |
| Ácido Eritórbico | Igual que el ácido ascórbico | Algunos autores reportan que el ácido eritórbico se destruye más rápidamente que el ácido ascórbico. | | Combinación 0.8% ácido ascórbico y 1.6% ácido eritórbico |
| Complejantes | | | | |
| Ciclodextrinas | Formación de complejos con sustratos PPO. Atrapamiento de sustratos de PPO o productos. | La formación de complejos no es específica. Eliminación potencial de compuestos de color y/o sabor. Costo: aun no autorizado. | Se sugiere su uso en combinación con otros agentes (acidulantes, quelantes, reductores) | |
| Quelantes | | | | |
| EDTA | Quelante de metal: enlaza al Cu al lado activo del PPO y el Cu disponible en el tejido | | Se usa comúnmente en combinación con otros químicos antipardeamiento | Se permite niveles de hasta 500ppm para disodio EDTA y calcio y disodio EDTA |

Fuente: AromatecA s.f.



Cuadro A- 5 Boleta para perfiles de sabor de Anona

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS



En el marco del desarrollo de la tesis "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."

NOMBRE: _____ **Edad** _____ **Fecha** _____

Frente a usted hay una muestra de puré de anona, la cual debe probar, describiendo las características de color y sabor que estén presentes en la muestra.

Marque con una X sobre la casilla* del término que más describa lo que usted siente por la muestra**.

* Marque con una X la casilla correspondiente, de acuerdo a la siguiente escala de intensidad:

5= Extrema, 4= grande, 3= media, 2= ligera, 1= casi imperceptible, 0= ausencia total (de indicación obligada).

**Táchese lo que no proceda

| T 0 | | | | | | | T 1 | | | | | | |
|----------------|----------------------|---|---|---|---|---|----------------|----------------------|---|---|---|---|---|
| SABOR | Escala de Intensidad | | | | | | SABOR | Escala de Intensidad | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Oscurecimiento | | | | | | | Oscurecimiento | | | | | | |
| Amargo | | | | | | | Amargo | | | | | | |
| Dulce | | | | | | | Dulce | | | | | | |
| Acido | | | | | | | Acido | | | | | | |
| Frutado | | | | | | | Frutado | | | | | | |
| Salado | | | | | | | Salado | | | | | | |
| Fermentado | | | | | | | Fermentado | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |

| T 2 | | | | | | | T 3 | | | | | | |
|----------------|----------------------|---|---|---|---|---|----------------|----------------------|---|---|---|---|---|
| SABOR | Escala de Intensidad | | | | | | SABOR | Escala de Intensidad | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Oscurecimiento | | | | | | | Oscurecimiento | | | | | | |
| Amargo | | | | | | | Amargo | | | | | | |
| Dulce | | | | | | | Dulce | | | | | | |
| Acido | | | | | | | Acido | | | | | | |
| Frutado | | | | | | | Frutado | | | | | | |
| Salado | | | | | | | Salado | | | | | | |
| Fermentado | | | | | | | Fermentado | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |

COMENTARIOS:

¡MUCHAS GRACIAS!

FIGURAS A

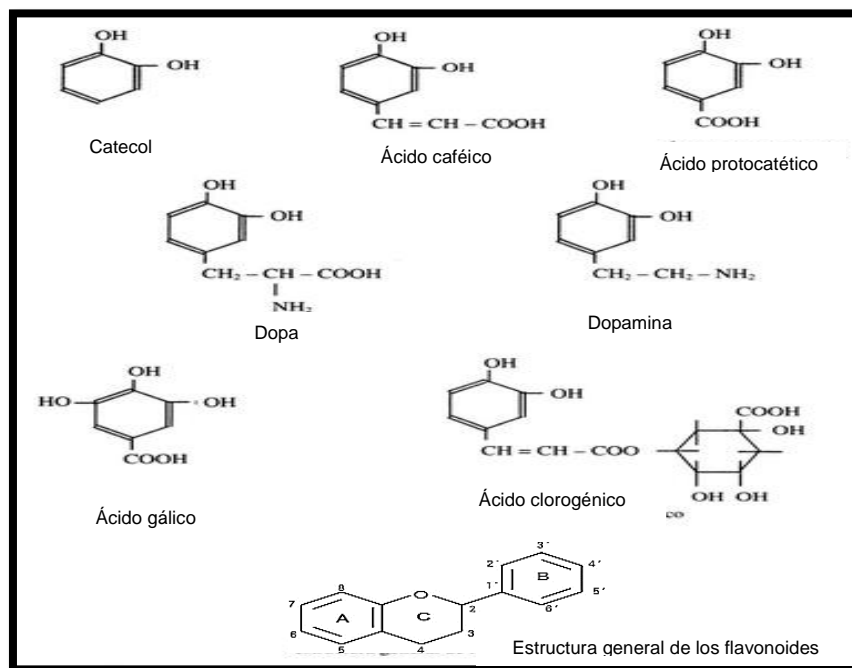


Figura A- 1 Principales sustratos del pardeamiento enzimático. Fuente: Bello Gutiérrez 2000

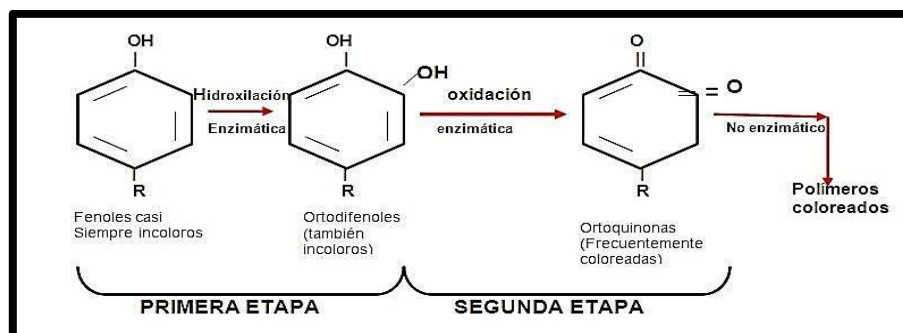


Figura A- 2 Fases de transformación del pardeamiento enzimático. Fuente: UNAD s.f.

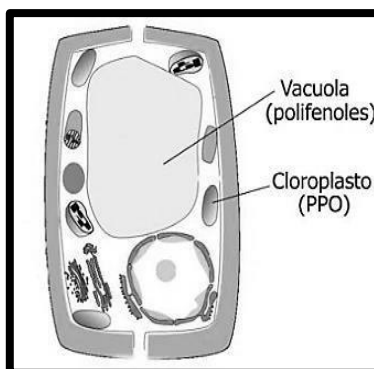


Figura A- 3 Polifenoloxidasas en célula vegetal. Fuente: López-Nicolás 2012.

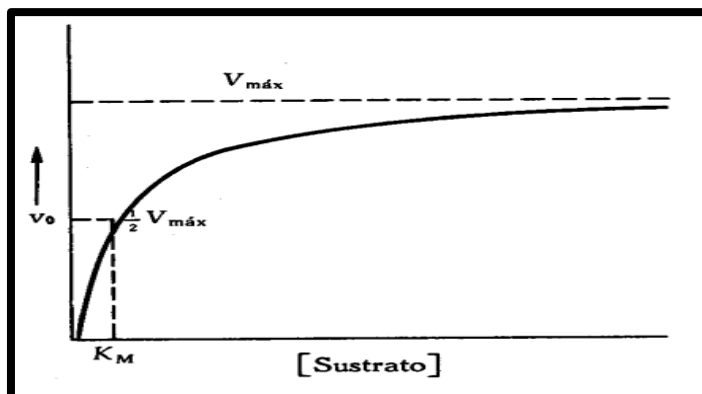


Figura A- 4 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción enzimática.

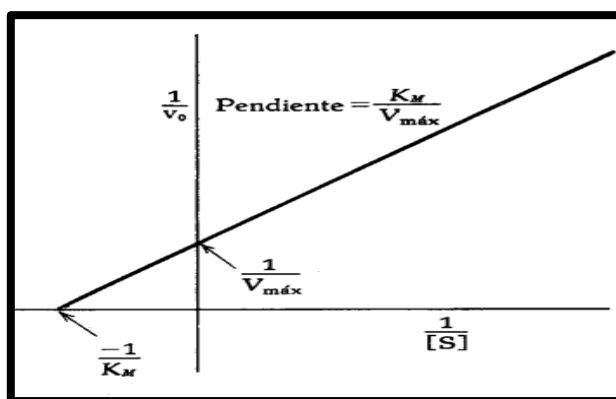


Figura A- 5 Representación doble recíproca, gráfico Lineweaver-Burk.

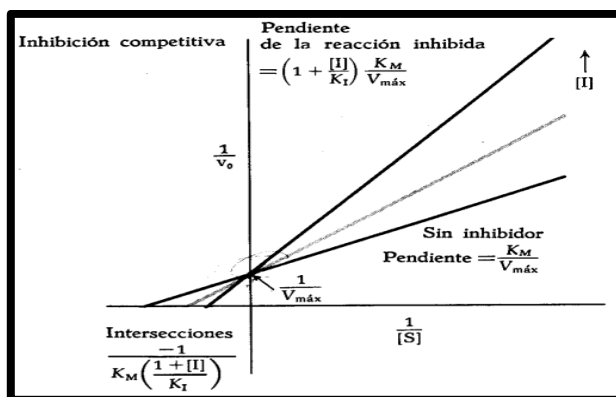


Figura A- 6 Inhibición competitiva. Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles recíprocos.

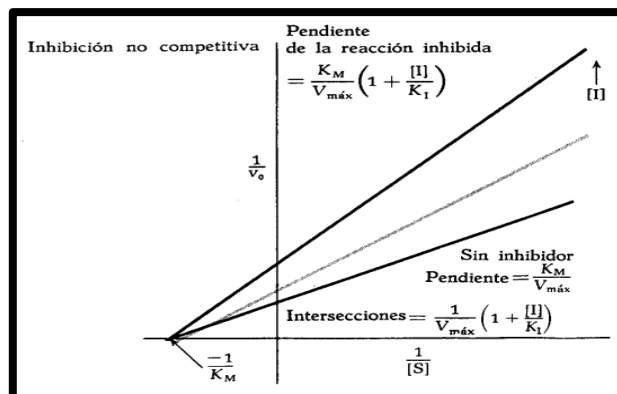


Figura A- 7 Inhibición no competitiva. Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles recíprocos.

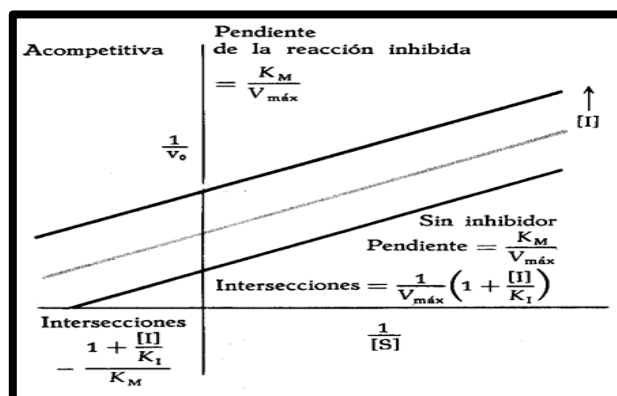


Figura A- 8 Inhibición acompetitiva. Cálculo de parámetros cinéticos mediante la representación de dobles recíprocos.



Figura A- 9 Cosecha de frutos.



Figura A- 10 Procesos de desinfección



Figura A- 11 Extracción de la pulpa.



Figura A- 12 Homogenización de la pulpa.



Figura A- 13 Preparación de unidades muestrales.



Figura A- 14 Aplicación del Antioxidante.



Figura A- 15 Almacenamiento de las muestras.



Figura A- 16 Capacidad para identificar sabores – etapa de selección.



Figura A- 17 Habilidad para diferenciar escalas de color – etapa de selección.



Figura A- 18 Centrífuga refrigerada marca Thermo® IEC Centra CL3R.

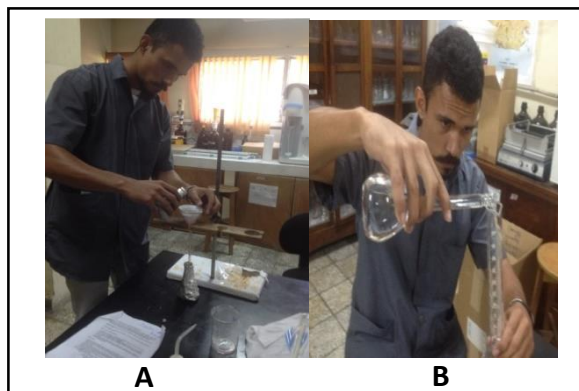


Figura A- 19 Preparación de soluciones buffer, Catecol y ácido ascórbico.



Figura A- 20 Recolección de los datos de absorbancia.

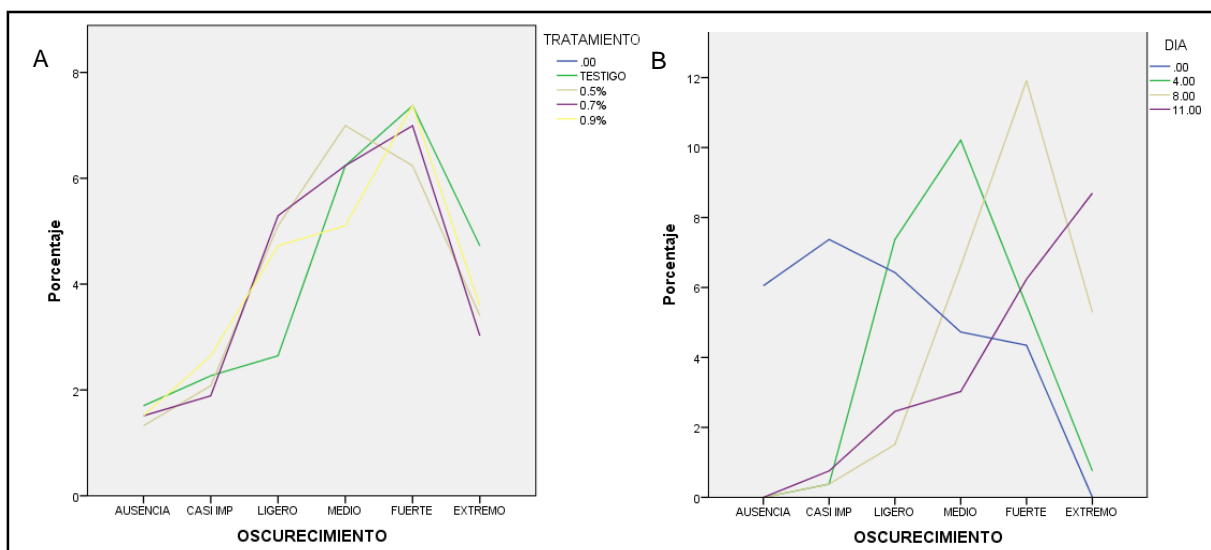


Figura A- 21 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Oscurecimiento por tratamiento y día.

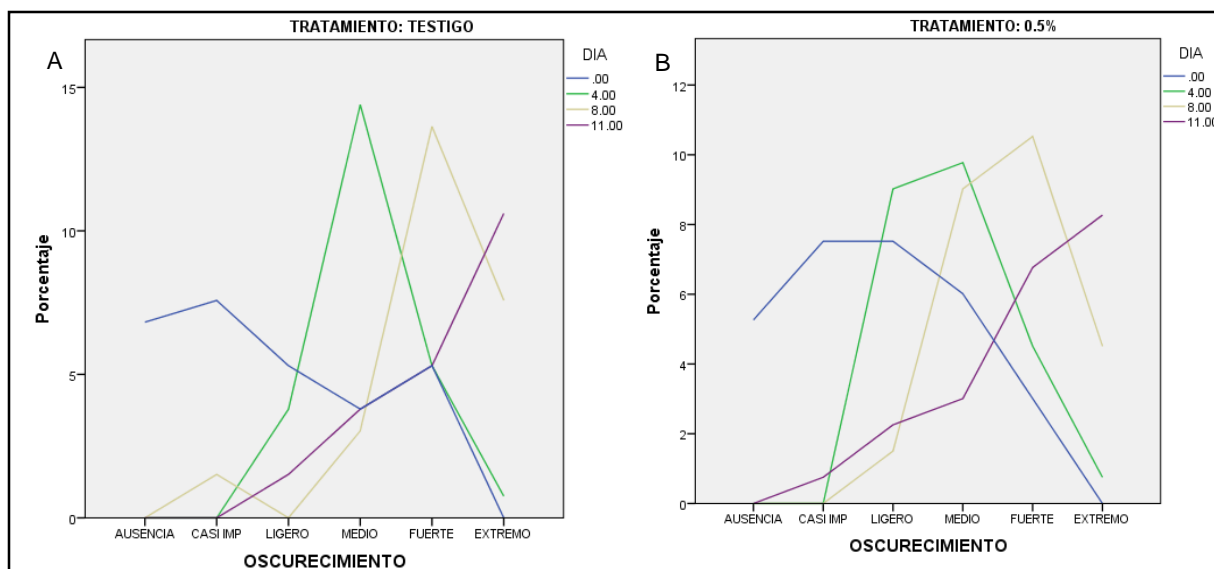


Figura A- 22 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Oscurecimiento (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico).

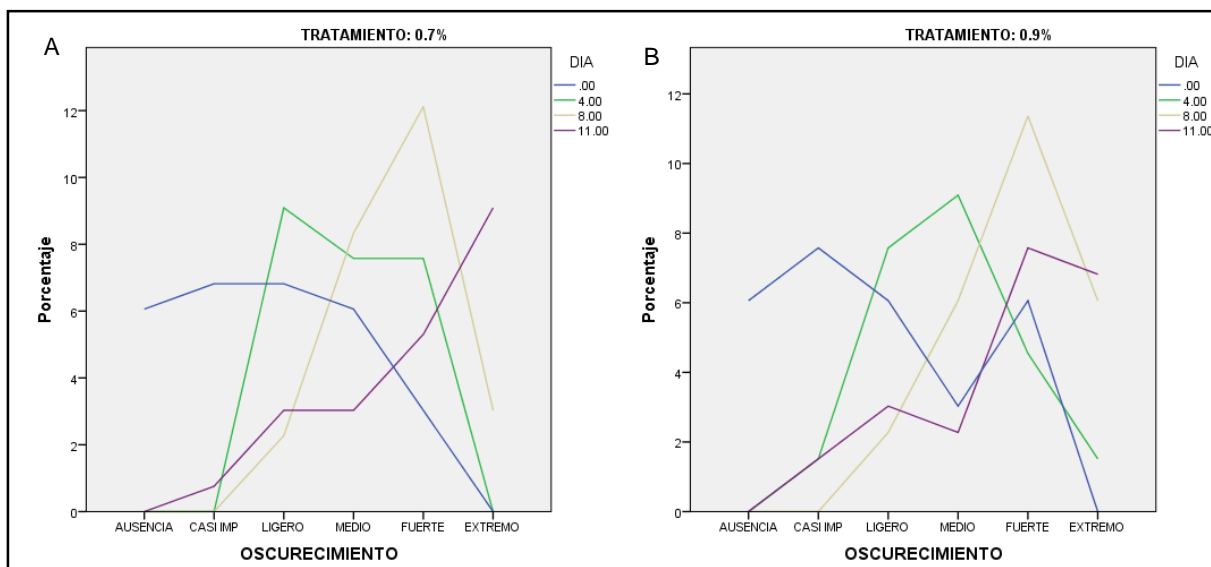


Figura A- 23 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Oscurecimiento(0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico).

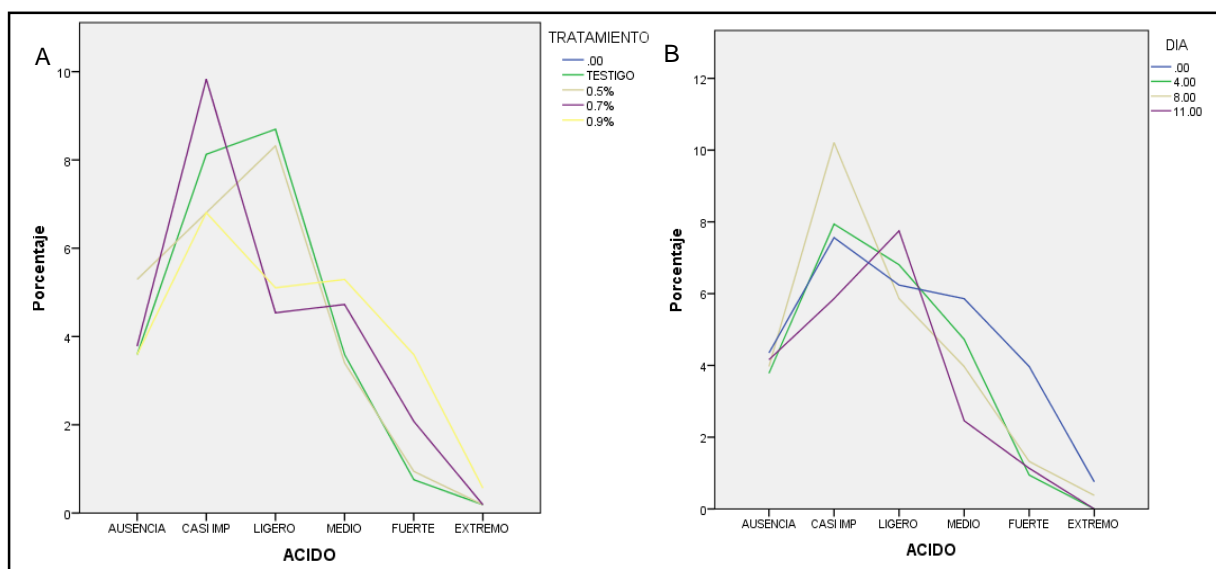


Figura A- 24 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Acido por tratamiento y día.

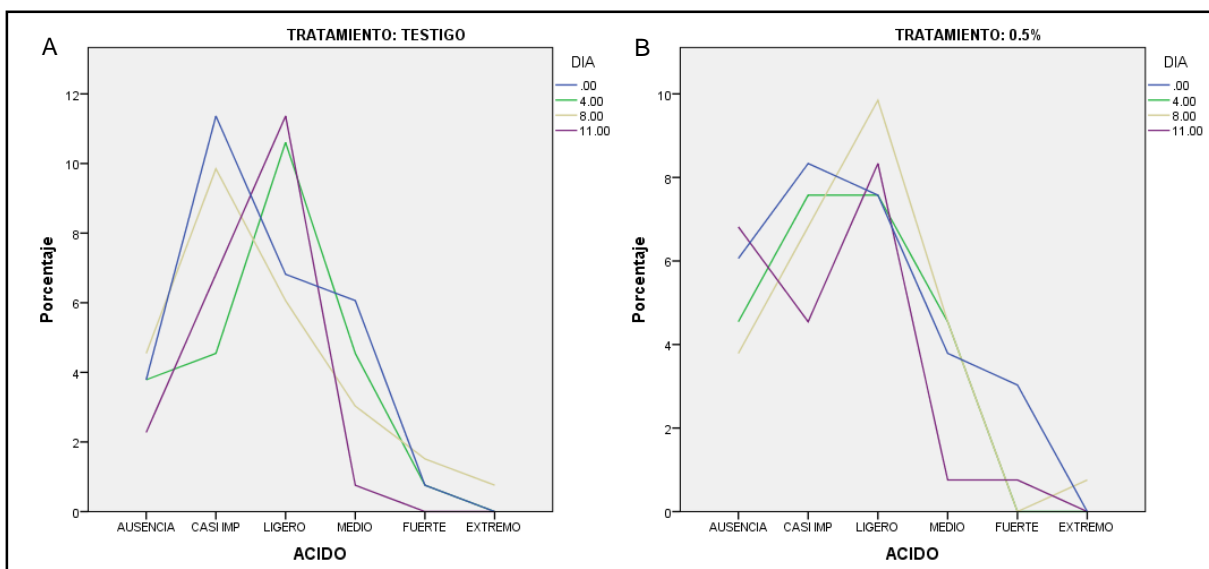


Figura A- 25 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Ácido (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico).

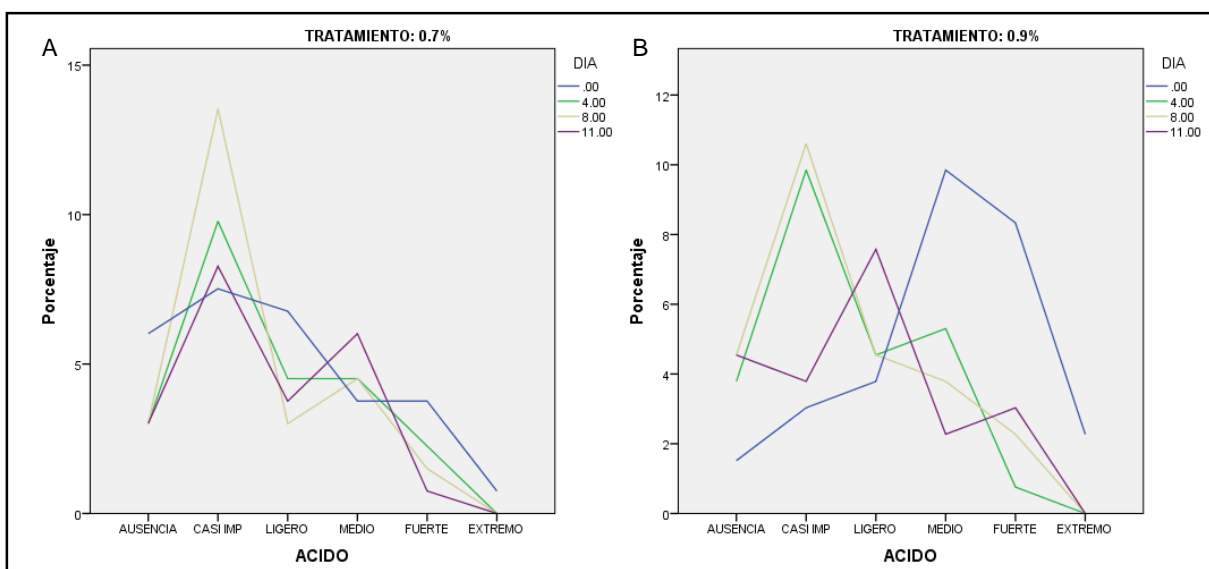


Figura A- 26 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Ácido (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico).

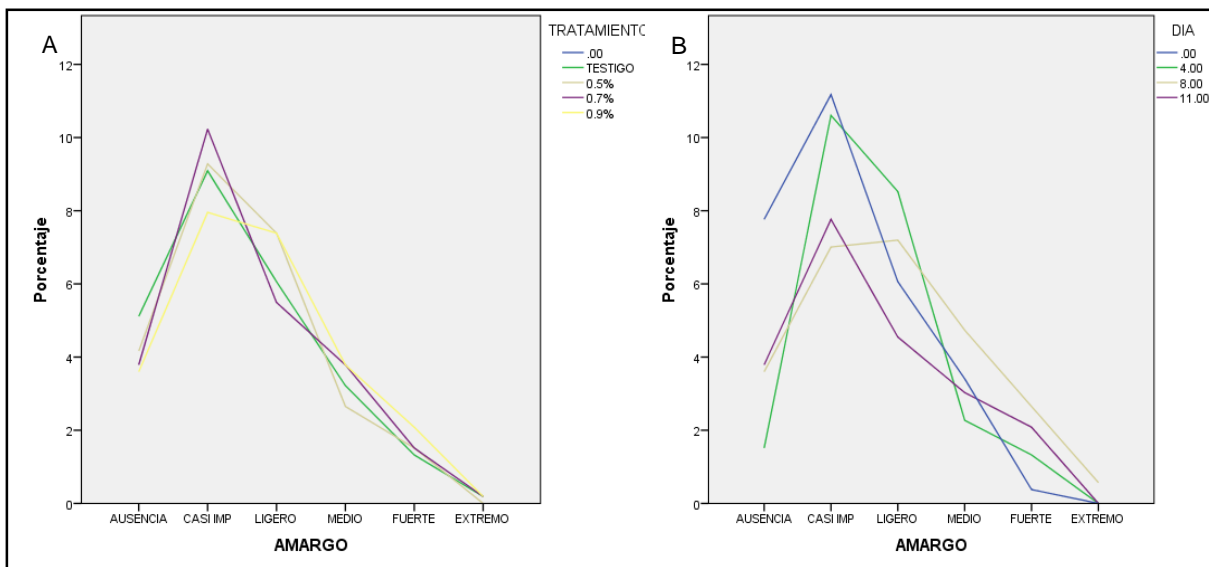


Figura A- 27 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Amargo por tratamiento y día.

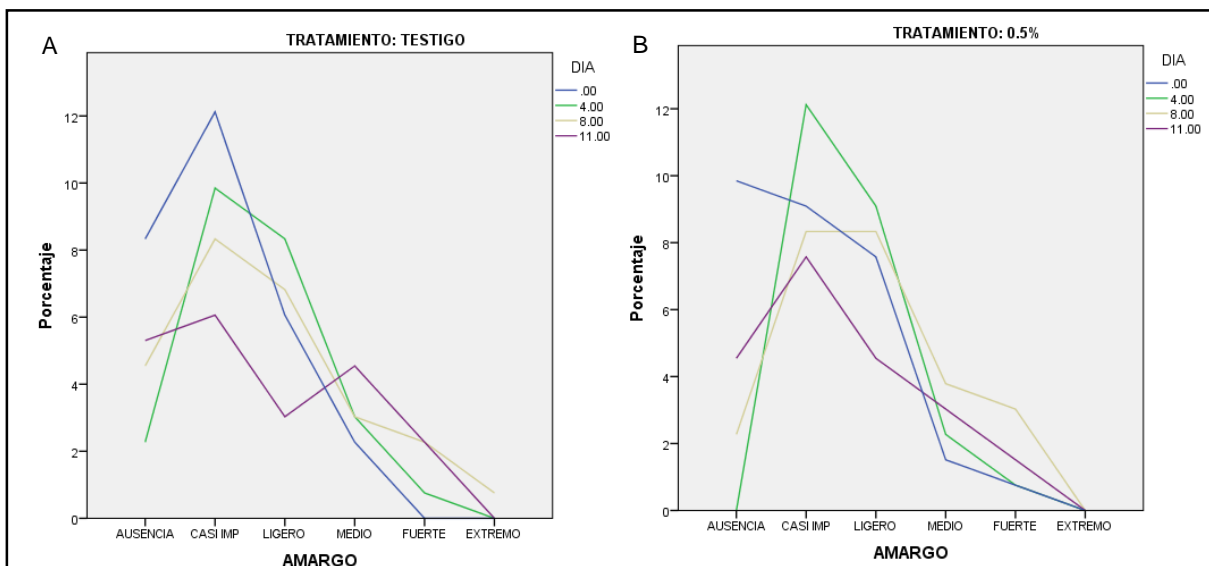


Figura A- 28 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Amargo (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico).

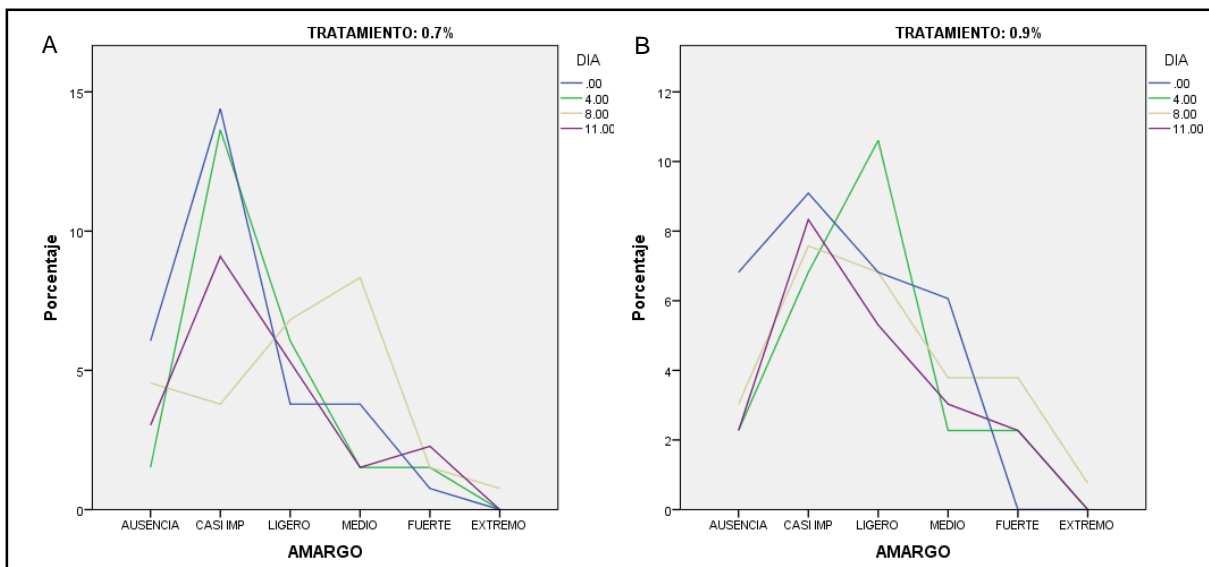


Figura A- 29 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Amargo (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico).

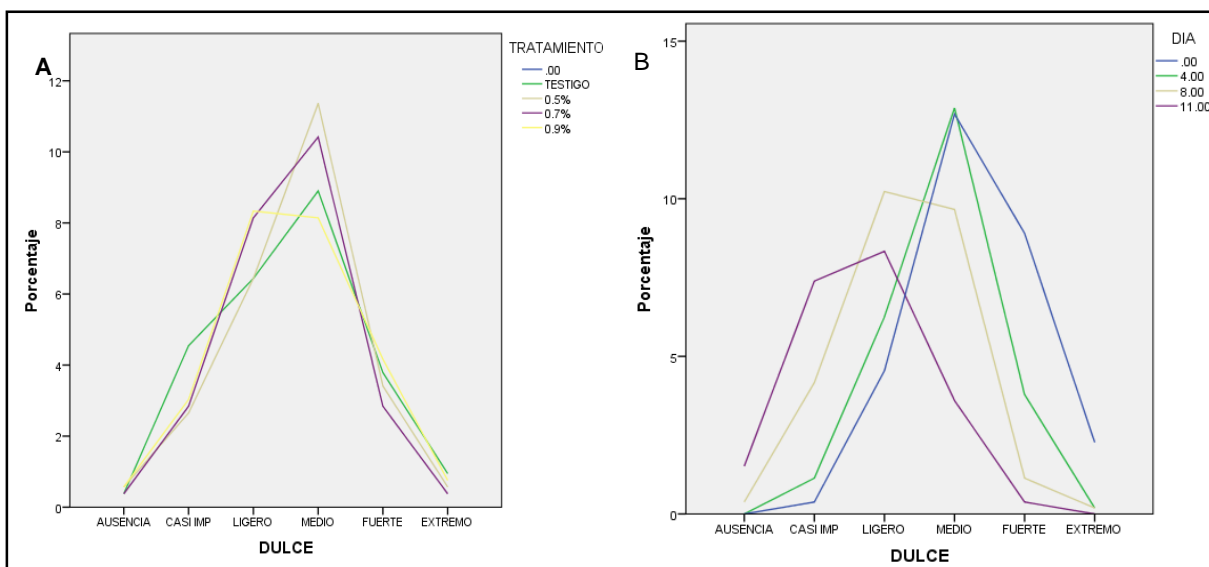


Figura A- 30 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Dulce por tratamiento y día.

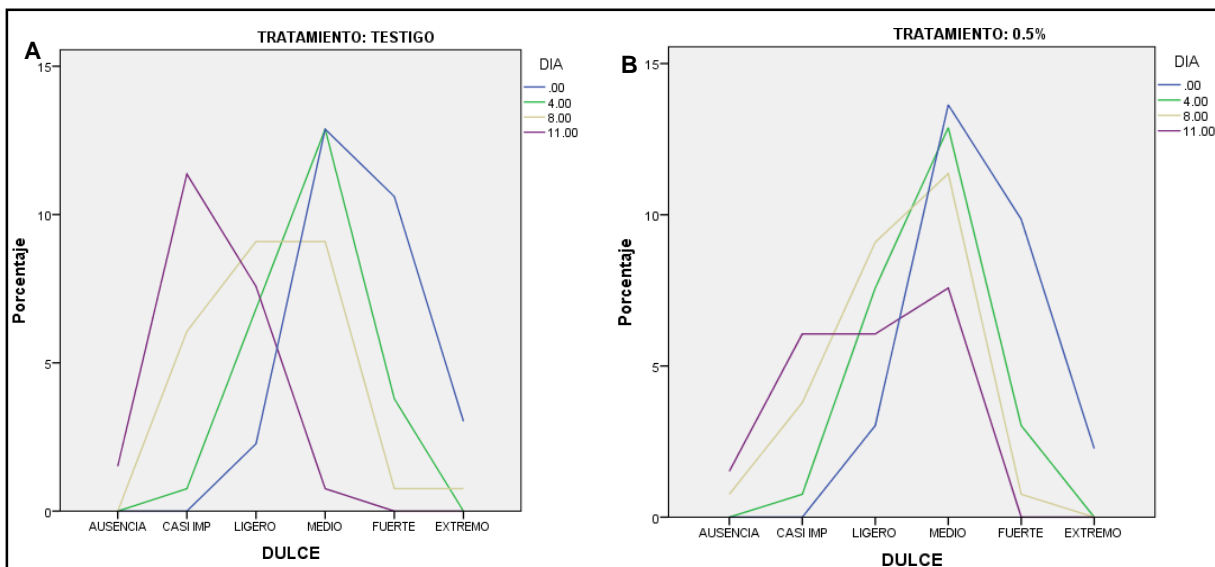


Figura A- 31 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo dulce (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico).

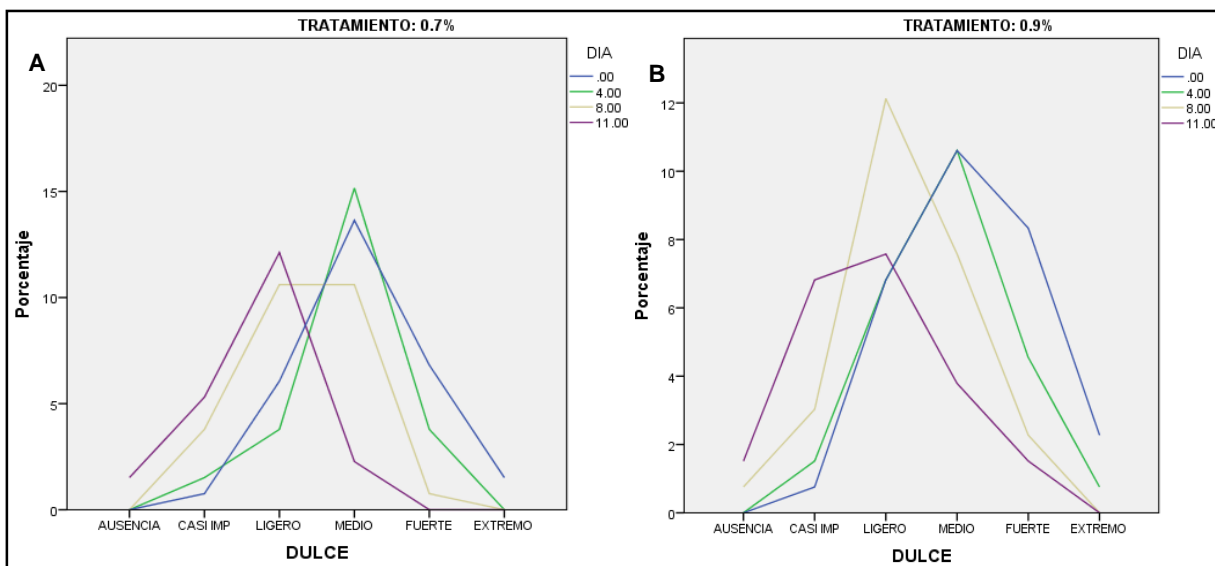


Figura A- 32 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Dulce (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico).

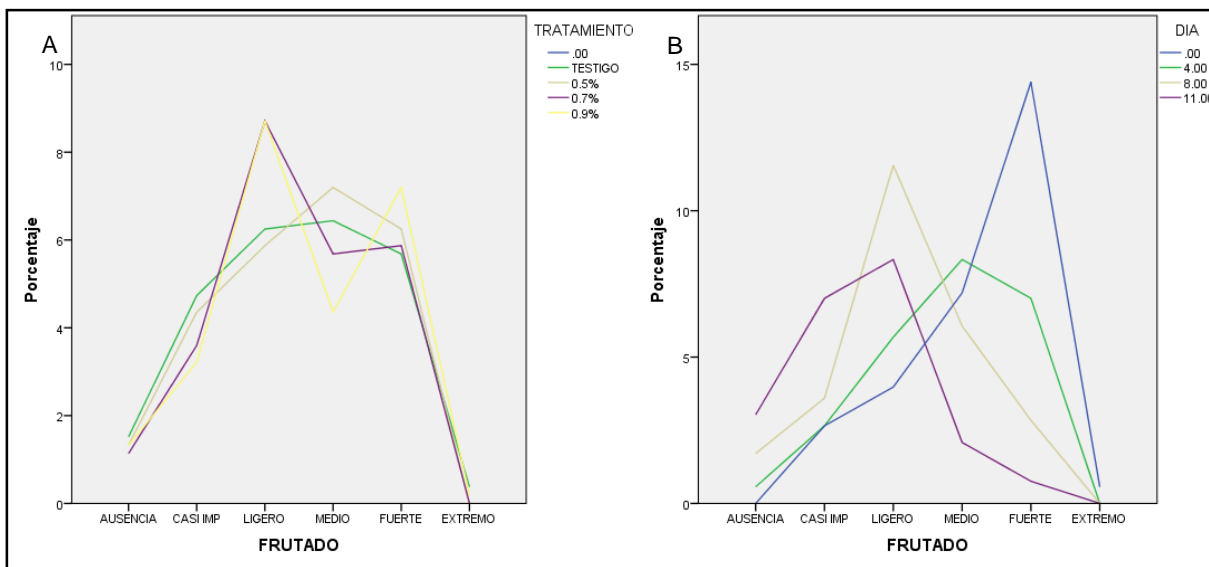


Figura A- 33 Efecto del ácido ascórbico sobre el atributo Frutado por tratamiento y día.

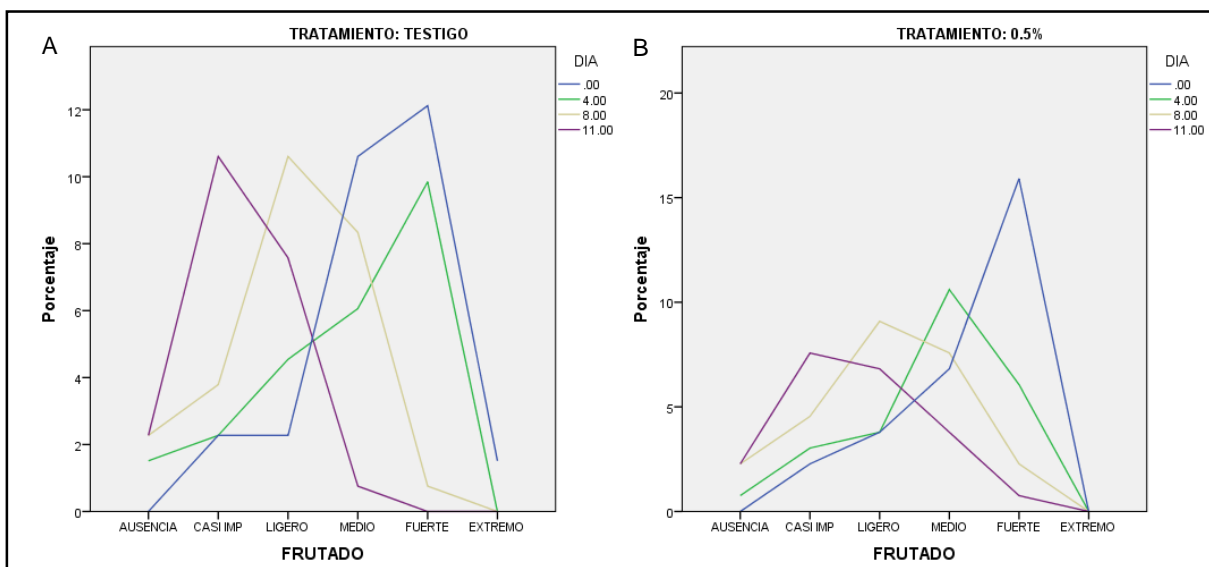


Figura A- 34 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Frutado (0.00 y 0.50% p/v ácido ascórbico).

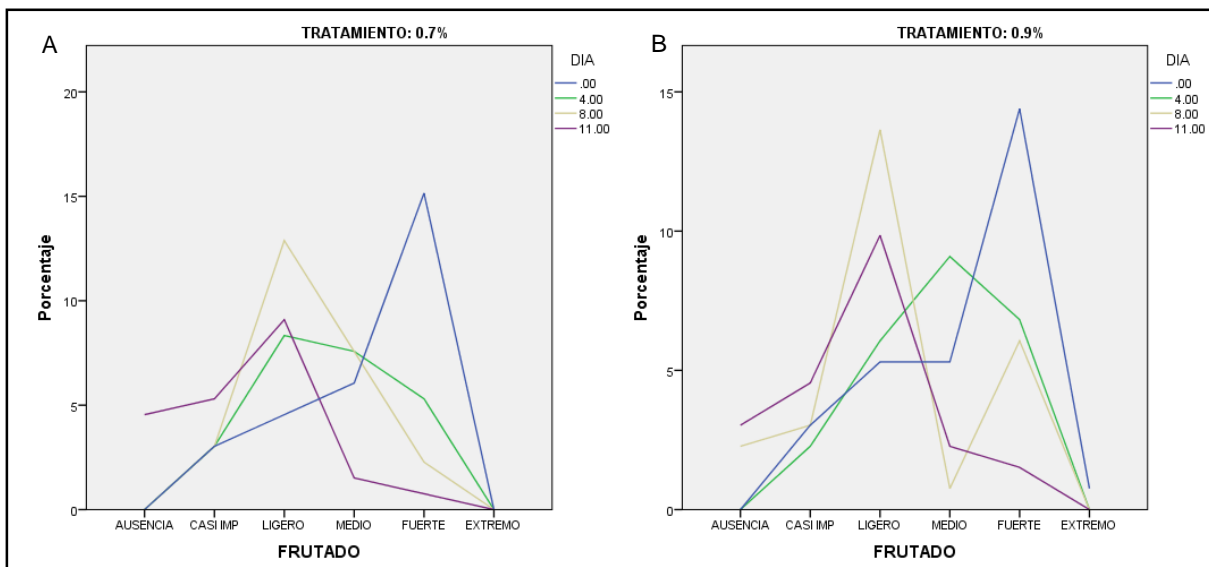


Figura A- 35 Comportamiento de la combinación Tratamiento-Día en el atributo Frutado (0.70 y 0.90% p/v ácido ascórbico).