



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

**Programa de Posgrado en Alimentos del Centro
de la República (PROPAC)**

**EFFECTO DEL ESTRÉS MECÁNICO Y DE FRÍO SOBRE EL
OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO DE DURAZNOS
[*Prunus persica* (L.) Batsch] DEL CENTRO DEL PAÍS.**

TESIS

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

Presenta:

Zoraida Lagunas Santamaría

DIRIGIDA POR:

Dr. Edmundo Mercado Silva

Santiago de Querétaro, Qro., Junio del 2002

No. Adq. H67421

No. Título _____

Clas 634.253

6182e

ej. 1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

“EFECTO DEL ESTRÉS MECÁNICO Y DE FRÍO SOBRE EL OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO DE DURAZNOS [*Prunus persica* (L.) Batsch] DEL CENTRO DEL PAÍS”

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

Zoraida Lagunas Santamaría

DIRIGIDA POR:

Dr. Edmundo Mercado Silva

SINODALES

Dr. Edmundo Mercado Silva
Presidente

Dr. Salvador Pérez González
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Suplente

M.C. Jorge Álvarez Domínguez
Suplente

M.C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad de Química

Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio de 2002

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a DIOS, por haberme permitido dar este paso más en mi vida como profesionista y lograr una meta tan anhelada.

A mis padres EMILIO y DELFINA, por todo el amor, cariño y apoyo incondicional que he recibido, así como sus palabras de impulso y superación.

A mis hermanos ZELMAR y EMILIO, por compartir conmigo muy buenos años en la infancia y adolescencia, por ser una parte importante del ser humano que ahora soy.

A mi Tía CELIA, que estuvo conmigo en mi infancia que me dio amor y compartió sus experiencias, así como consejos que me han ayudado a lo largo de este trayecto de vida.

A LLEYMI, por ser una gran amiga, por haber compartido tanto tiempo juntas y ser una persona de la que aprendo muchas cosas, entre ellas su constancia y disciplina.

A ODI, mi gran amigo fiel e incondicional que ha estado conmigo siempre en las buenas y en las malas.

A JOSÉ ESTRADA, por estar a mi lado durante estos 5 años, por su comprensión y apoyo, además de ser un gran compañero.

A la familia RANGEL URIBE, por su apoyo, amabilidad y calidez durante mi estancia en Querétaro, por hacerme sentir como en familia.

A SUSANA RANGEL, por haberla conocido y considerarla una verdadera amiga, porque siempre sentí un apoyo en su hombro.

Al Dr. EDMUNDO MERCADO SILVA, una gran persona en todos los ámbitos, a la que admiro y agradezco su apoyo y paciencia para lograr ver finalizado este proyecto.

A mis sinodales:

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

Dr. SALVADOR PÉREZ GONZÁLEZ

M.C. JORGE ÁLVAREZ DOMINGUEZ

Por su contribución al mejoramiento de esta tesis, así como por sus acertados comentarios y sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio, con los cuales compartí durante 1 año, y de los que aprendí mucho especialmente a Nora; así como Estela, Gerardo, Rafa, Osvaldo, Berenice, Rocío Meraz, Rocío Rivas, Edmundo, Erica y Miguel.

Al CONACYT, por su apoyo financiero, institución por medio de la que podemos ver cristalizada la oportunidad de realizar estudios de posgrado.

Al ING. CARLOS MARTÍNEZ, quien en varias ocasiones nos proporcionó materiales para realizar los experimentos.

A los trabajadores administrativos que siempre estuvieron dispuestos a colaborar con nosotros (los alumnos): Carmelita, Laurita, Silvia, Benjamín, Emiliano y Víctor.

RESUMEN

El durazno es un fruto importante a nivel mundial, debido a sus características organolépticas; su producción en México alcanza las 128,604 toneladas siendo Zacatecas, Aguascalientes y Michoacán los principales estados productores. El oscurecimiento enzimático que presenta este fruto durante su manejo poscosecha es uno de los problemas más importantes que enfrentan productores, comercializadores y consumidores. Los objetivos de este trabajo fueron: (i) Caracterizar 47 materiales genéticos procedentes de las zonas de Michoacán (10), Aguascalientes (18) y Querétaro (19) desde el punto de vista de su susceptibilidad al oscurecimiento a través de la cuantificación de sus contenidos de fenoles totales, flavonoides y actividad de PPO. (ii) Estudiar el proceso de oscurecimiento en dos materiales contrastantes en su tendencia al oscurecimiento (variedades 'Regio' de Michoacán y 'Criollo tardío' de Aguascalientes), en respuesta al daño mecánico provocado por los impactos de una masa de acero de forma esférica de 60 g que caía libremente desde una altura de 30 cm. (iii) Estudiar el oscurecimiento enzimático y la harinosidad debidos al daño por frío en frutos almacenados a 5°C durante cuatro semanas y compararlo con frutos almacenados a 20°C. (iv) Evaluar la factibilidad para controlar el oscurecimiento enzimático a través de la infiltración al vacío de soluciones 10mM de ácido ascórbico, cisteína, NaCl y 4 hexil resorcinol, así como de la inmersión de los frutos en agua a 50°C a diferentes tiempos. Las variables estudiadas fueron las actividades de PPO y peroxidasa (POD) en la piel de los frutos, potencial de oscurecimiento, cuantificación de fenoles y flavonoides totales así como la identificación y cuantificación del tipo de fenoles por HPLC. Los frutos procedentes de la zona de Michoacán tuvieron un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales y mayores actividades de PPO en comparación con los frutos de Aguascalientes y Querétaro; aun cuando los niveles de estos factores no se correlacionaron adecuadamente con la tendencia al oscurecimiento. Los frutos sometidos al impacto mecánico sugieren que en el fenómeno de oscurecimiento puede estar involucrada la POD manifestándose en un decremento de su actividad posterior al daño en los frutos de menor tendencia al oscurecimiento en contraste con un aumento de esta actividad en los frutos de mayor tendencia. Los contenidos de ácido clorogénico y catequina pueden ser parte importante en el proceso de oscurecimiento. El almacenamiento refrigerado indicó que estos frutos pueden ser almacenados durante dos semanas a 5°C sin que se manifieste el desarrollo de la harinosidad en los frutos; los frutos más susceptibles a este problema fueron los de la variedad 'Criollo tardío' en comparación con los de la variedad 'Regio'. Los tratamientos para controlar el oscurecimiento en los frutos de durazno no fueron eficaces para inhibir completamente las actividades de PPO y POD; no obstante, el 4 hexil resorcinol mostró los más altos valores de inhibición para PPO y el ácido ascórbico para POD indicando con ello ciertas posibilidades para ser utilizados como inhibidores del oscurecimiento.

Palabras clave: durazno, oscurecimiento enzimático, susceptibilidad al oscurecimiento, daño mecánico, daño por frío, harinosidad, inhibidores del oscurecimiento.

SUMMARY

Peach is an important fruit, because of its organoleptic characteristics; having México a production of 128,604 ton, being the states of Zacatecas, Aguascalientes, and Michoacan the highest producers. Enzymatic browning shown by this product during postharvest management is one of the major problems than producers and consumers have. The cause of this problem has been faced by the generation of cultivars, to obtain materials with low browning tendency, or trying to find compounds capable to inhibit the development of this reaction. Eventhough still exist doubts about the mechanism of how the reaction occurs. The objectives of this work were: i) Characterize genetic materials from Michoacan(10), Aguascalientes(18) and Queretaro(19) from the point of view of susceptibility to browning through the quantification of their total phenols, flavonoids and PPO activity contents. (ii) To study the enzymatic browning process of two contrasting materials in relation to their browning tendency (cultivars 'Regio' from Michoacan and 'Criollo tardío' from Aguascalientes) in their response to mechanical damage caused by impacts with an spherical steel ball of 60 g that downfall from a height of 30 cm. iii) To study enzymatic browning and mealliness due to chilling injury in fruits kept at storage during 4 weeks and comparing them with fruits stored at 20°C. (iv) To evaluate the factibility to control enzymatic browning through infiltration with vacuum of different solutions: 10 mM of ascorbic acid, cisteine, NaCl and 4-hexylresorcinol, eventhough the immersion of fruits in water at 50°C at different times. The parameters studied in the skin of fruits were PPO and POD activities, and the ones measured in pulp were browning potential, quantification of total phenols and flavonoids also the identification and quantification of the type of phenols by HPLC. Fruits from Michoacan had higher content of total phenols and flavonoids and also higher PPO activities compared with fruits from Aguascalientes and Queretaro; although the levels of this factors did not correlationate adequately with their browning tendency. Fruits submitted to mechanical impact suggested that probably in the browning phenomenon, POD activity could be involved, presenting a decrease in activity after damage in fruits with less browning tendency, and an increase in fruits with higher tendency. Clorogenic acid and catequin contents can be an important part in the enzymatic browning process. Cold storage indicated than peaches can be stored during 2 weeks at 5°C without mealliness development; fruits most susceptible to this problem were 'Criollo tardío' cultivar in relation with 'Regio'. Treatments to control browning in peach fruits were not effective to inhibit PPO and POD activities completely; eventhough, 4-hexyl-resorcinol showed the highest values of PPO inhibition, and ascorbic acid to POD, indicating with these results certain probabilities to be used as enzymatic browning inhibitors.

Keywords: peach, enzymatic browning, browning susceptibility, mechanical damage, chilling injury, mealiness, browning inhibitors.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | I |
| SUMMARY | II |
| ÍNDICE GENERAL | III |
| ÍNDICE DE CUADROS | V |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| II.1. GENERALIDADES DEL DURAZNO | 4 |
| II.1.1. Origen | 4 |
| II.1.2. Expansión territorial | 4 |
| II.1.3. Descripción botánica | 5 |
| II.1.4. Composición química | 6 |
| II.1.5. Importancia económica | 10 |
| II.1.6. Problemática mundial en poscosecha | 12 |
| II.2. OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO | 13 |
| II.2.1. Compuestos fenólicos | 13 |
| II.2.2. Enzimas oxidorreductasas | 15 |
| II.3. MÉTODOS DE PREVENCIÓN DEL OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO | 22 |
| II.3.1. Principios de la prevención del oscurecimiento | 22 |
| II.4. PREVENCIÓN DEL OSCURECIMIENTO EN DURAZNO | 27 |
| II.4.1. Investigaciones desarrolladas en la actualidad | 27 |
| III. OBJETIVOS | 30 |
| III.1. OBJETIVO GENERAL | 30 |
| III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| IV.1. MATERIAL BIOLÓGICO | 31 |
| IV.1.1. Origen geográfico de los cultivares | 31 |
| IV.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 33 |
| IV.2.1. Preparación de los frutos | 33 |
| IV.3. METODOS EMPLEADOS | 33 |
| IV.3.1. Principales variables asociadas con el oscurecimiento | 40 |
| IV.3.2. Variables asociadas indirectamente con el oscurecimiento | 41 |
| IV.3.3. Efecto de antioxidantes e inhibidores de actividad de PPO | 44 |
| IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 45 |
| V. RESULTADOS | 45 |
| V.1. ANALISIS PRELIMINARES | 45 |
| V.1.1. Diferencia en medición de actividad de PPO en piel y pulpa | 45 |

| | |
|---|-----|
| V.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES CULTIVARES PROVENIENTES DEL CENTRO DEL PAIS | 46 |
| V.2.1. Actividad de PPO, contenido de fenoles y flavonoides | 46 |
| V.3. EFECTO DE DAÑO MECÁNICO | 55 |
| V.3.1. Principales variables asociadas con el oscurecimiento | 56 |
| V.3.2. Variables asociadas indirectamente con el oscurecimiento | 64 |
| V.4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO REFRIGERADO | 67 |
| V.4.1. Cambios en variables asociadas con el oscurecimiento | 68 |
| V.4.2. Variables asociadas indirectamente con el oscurecimiento | 76 |
| V.5. EFECTO DE ANTIOXIDANTES E INHIBIDORES SOBRE ACTIVIDAD DE PPO | 79 |
| V.5.1. Estudios " <u>in vitro</u> " | 79 |
| V.5.2. Estudios " <u>in vivo</u> " | 81 |
| VI. DISCUSIÓN | 84 |
| VII. CONCLUSIONES | 101 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 104 |
| APÉNDICE | 112 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Composición química aproximada del durazno. | 9 |
| 2 | Superficie cosechada, producción y valor de la producción de durazno por Entidad Federativa, (1997). | 11 |
| 3 | Clasificación de inhibidores de las enzimas o-difenol-oxidasas. | 23 |
| 4 | Efecto de distintos inhibidores del oscurecimiento en duraznos de la variedad 'Elberta' (E) y 'Ford'(F). | 28 |
| 5 | Resultado de actividad enzimática, contenido de fenoles, flavonoides y oscurecimiento subjetivo observado en diferentes variedades de durazno de distintas regiones del país. | 48 |
| 6 | Valores concentrados obtenidos para el análisis de Componentes principales. | 50 |
| 7 | Grupos obtenidos para los cultivares analizados mediante el análisis de agrupamiento o cúmulos. | 54 |
| 8 | Niveles de significancia de las distintas variables involucradas en el desarrollo de oscurecimiento de frutos de durazno sometidos a daño mecánico. | 56 |
| 9 | Niveles de significancia de las distintas variables involucradas en el desarrollo de oscurecimiento de frutos de durazno almacenados a 5 y 20°C. | 68 |
| 10 | Inactivación "in vitro" con distintos agentes anti-oscurecimiento. | 80 |
| 11 | Porcentaje de inhibición de actividad de PPO y POD en duraznos 'Criollo tardío' sometidos a inmersión, infiltración a vacío y tratamiento térmico. | 82 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Características comúnmente presentadas por duraznos del centro del País. | 6 |
| 2 | Principales países productores de durazno. | 10 |
| 3 | Reacciones catalizadas por PPO. | 15 |
| 4 | Mecanismo cíclico de reacción de POD, utilizando guayacol como sustrato donador de electrones. | 18 |
| 5 | Actividad de PPO en piel y pulpa de duraznos 'S.J.A.Soto' de Michoacán. | 45 |
| 6 | Agrupamiento de las diferentes selecciones de acuerdo al análisis de Componente principales. | 51 |
| 7 | Agrupación de los distintos cultivares de durazno de acuerdo al análisis estadístico de agrupamiento. | 53 |
| 8 | Potencial de oscurecimiento en frutos control y sometidos a impactos con una masa de acero de 60 g desde 30 cm de altura, de la variedad: a)'Criollo tardío' y b)'Regio'. | 57 |
| 9 | Cambios en la actividad enzimática de PPO y POD en frutos control y dañados mecánicamente: a)'Criollo tardío', b)'Regio'. | 59 |
| 10 | Efecto de golpe con balón sobre la pulpa de duraznos de la variedad 'Regio' en el tercer día de almacenamiento (72 h). | 59 |
| 11 | Cuantificación de fenoles totales expresados como mg de ácido cumárico/g.p.f., en frutos control y dañados mecánicamente, a)'Criollo tardío' y b)'Regio'. | 60 |
| 12 | Cromatograma de extractos fenólicos de frutos del cultivar 'Criollo tardío' con daño mecánico y control después de 72 h. | 62 |
| 13 | Cromatograma de extractos fenólicos de frutos del cultivar 'Regio' con daño mecánico y control después de 72 h. | 62 |

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 14 | Contenido de ácido clorogénico y catequina en frutos de durazno de dos variedades contrastantes, después de haber sido impactados con una masa de 60 g desde una altura de 30 cm, a)'Criollo tardío' y b)'Regio'. | 63 |
| 15 | Cambios en el contenido de flavonoides en frutos dañados y control, almacenados a 20°C en dos variedades: a)'Criollo tardío' y b)'Regio'. | 64 |
| 16 | Porcentaje de conductividad de duraznos de la variedad: a) 'Criollo tardío' y b)'Regio' en frutos control y dañados mecánicamente almacenados durante 4 días (96h) a 20°C. | 65 |
| 17 | Falta de jugosidad manifestada por los frutos de la variedad: a) 'Criollo tardío' y b)'Regio' después de haber sido impactados con una balín de 60 g y almacenados durante cuatro días a 20°C. | 66 |
| 18 | Cambios en el potencial de oscurecimiento en dos variedades de duraznos almacenados a 5°C y sus respectivas transferencias a 20°C: a)'Criollo tardío', b)'Regio'. | 69 |
| 19 | Actividad enzimática de polifenoloxidasa y peroxidasa en frutos de durazno: a)'Criollo tardío' y b)'Regio', sujetos a almacenamiento de 5°C y (5+20)°C durante 4 semanas. | 71 |
| 20 | Contenido de fenoles totales en frutos con almacenamiento refrigerado durante 4 semanas a 5°C y (5+20)°C del cultivar: a)'Criollo tardío' y b)'Regio'. | 72 |
| 21 | Cromatograma de extractos fenólicos de pulpa de duraznos del cultivar 'Criollo tardío' almacenados 3 semanas a 5°C y transferidos de 5 a 20°C. | 74 |

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 22 | Cromatograma de extractos fenólicos de pulpa de duraznos del cultivar 'Regio' almacenados 3 semanas a 5°C y transferidos de 5 a 20°C. | 74 |
| 23 | Contenido de ácido clorogénico y catequina en frutos de durazno a)'Criollo tardío' y b)'Regio' sometidos a temperaturas de 5°C y (5+20)°C durante 28 días. | 75 |
| 24 | Cambios en el contenido de flavonoides en frutos de durazno a)'Criollo tardío' y b)'Regio' sujetos a almacenamiento refrigerado durante 28 días. | 76 |
| 25 | Porcentaje de conductividad total manifestada por frutos de la variedad a)'Criollo tardío' y b)'Regio' almacenados a 5°C y sus respectivas transferencias a 20°C. | 77 |
| 26 | Desarrollo de harinosidad en duraznos de dos variedades almacenadas durante 28 días a 5°C y sus transferencias a 20°C: a)'Criollo tardío' y b)'Regio'. | 78 |

I. INTRODUCCIÓN

El durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch), es uno de los frutos más importantes a nivel mundial y muy apreciado por sus características organolépticas. No obstante, durante el periodo poscosecha manifiesta el desarrollo de oscurecimiento enzimático, lo que provoca la disminución de su calidad visual, además de pérdida de sabor y calidad nutricional. Por lo tanto el consumidor rechaza a aquellos productos comestibles con éstas características, traduciéndose esto a su vez, en pérdidas económicas del producto fresco.

Entre los principales factores que pueden propiciar esta pérdida de calidad se encuentran el daño mecánico y el daño por frío, además del contenido de fenoles y grado de actividad enzimática que el fruto presente (Crisosto y col., 1993). Aunque es importante señalar, que el grado de susceptibilidad del fruto a las diferentes situaciones de estrés se ve influenciado por diversos factores tales como la variedad, el estado de madurez, tamaño y peso, características de la piel y condiciones ambientales en las cuales se desarrolló el producto (Marqués y col., 1995).

La teoría que se ha aceptado universalmente como mecanismo generador del oscurecimiento enzimático en frutas y hortalizas señala que: la enzima polifenoloxidasa (PPO) en presencia de oxígeno cataliza la oxidación de los ortodifenoles produciendo quinonas que posteriormente forman compuestos oscuros, asumiendo que el tejido dañado pierde la organización interna de la célula y permite la interacción de la enzima con el sustrato para formar dichas quinonas reactivas, que interactúan a su vez con otras quinonas, aminoácidos, azúcares reductores, etc., para formar polímeros que generan el oscurecimiento (Lee y col., 1990). Sin embargo, existen numerosos reportes en los que al realizar la evaluación de la actividad de ésta enzima, así como la cuantificación del

contenido de fenoles totales no se encuentra una correlación directa entre éstas variables y el oscurecimiento manifestado por el tejido.

En países productores de durazno, se han llevado a cabo diferentes estudios tendientes a caracterizar sus materiales genéticos con el objeto de tener un conocimiento más detallado de cada una de ellas y apoyar con ello sus programas de mejoramiento genético así como para dar información a los productores respecto de las características de los materiales que puede utilizar (Lee y col., 1990). No obstante, el mecanismo de cómo ocurre el proceso no está bien establecido ya que el esquema generalmente aceptado en muchas ocasiones no explica completamente el comportamiento en distintos materiales (Cheng y Crisosto, 1995).

En México hay escasos reportes sobre la caracterización de las distintas variedades que se producen en distintas zonas del país en cuanto a su susceptibilidad al oscurecimiento (González-Rodríguez, 1999) o que intenten dar una respuesta práctica al problema de oscurecimiento (Mercado-Silva, 1999). Por lo que los resultados de este estudio serían de gran utilidad para el desarrollo de variedades mejoradas así como para proponer un manejo más adecuado del fruto y tener un mejor conocimiento del proceso de oscurecimiento.

Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar diferentes variedades y selecciones de durazno procedentes de Michoacán, Aguascalientes y Querétaro con el fin de dar apoyo al programa de mejoramiento genético para crear variedades tolerantes al oscurecimiento, así como también determinar las correlaciones que se presentan entre los cambios de actividad de PPO Y POD, contenido de fenoles y flavonoides, conductividad y harinosidad en duraznos sujetos a dos tipos de estrés, el daño mecánico y el daño por frío. Así mismo se estudió el empleo de soluciones de algunos agentes antioscurecimiento y tratamientos hidrotérmicos para inhibir la actividad de las enzimas involucradas en

el proceso o alterar el curso de la reacción y de esta manera reforzar los esfuerzos para dar solución a este problema.

Por lo que en el presente trabajo, además de los factores anteriormente mencionados, se considera la participación de factores adicionales, como sería la posible participación de otras enzimas oxidorreductasas como la peroxidasa (POD), la identificación de los sustratos involucrados en las reacciones de oscurecimiento, así como la evaluación conjunta de variables como son la conductividad y pérdida de jugosidad; con la finalidad de obtener mayor información sobre el fenómeno. Considerando (de acuerdo a reportes), que los dos generadores principales del oscurecimiento enzimático, y por los que se tienen mayores porcentajes en pérdidas poscosecha son el daño mecánico y el daño por almacenamiento refrigerado.

II. REVISION DE LITERATURA

II.1. Generalidades del durazno

II.1.1. Origen

El durazno (*Prunus Persica* (L.) Batsch), es uno de los frutos de hueso más importantes del mundo. Es originario de China, donde se inició su cultivo desde el año 2000 a.C.

Consecuente con su lugar de origen, se ha estimado que debido a la diversidad de climas, en China existen alrededor de 1000 variedades, y debido a la adaptación y preferencias de los consumidores al sabor de tipos particulares de este fruto, los hacen característicos de algunas regiones de ese país (Moore y Ballington, 1991); donde se reconocen tres grupos de variedades: las del Sur, las cuales crecen a lo largo del Río Yangtze, en donde el clima es similar al sudeste de los Estados Unidos; estos duraznos están representados por la variedad 'Shangai Shuimi' que se desarrollan bien en climas calurosos y toleran climas húmedos. El grupo del Norte se encuentra distribuido a lo largo del río Amarillo, en donde los inviernos son fríos y el verano caliente y seco; estos tienden a ser tolerantes al frío. Los subgrupos Mitao y Miantao representan este grupo. Un tercer grupo se localiza en el noroeste árido de China, de donde son característicos los duraznos de pulpa amarilla, en contraste a los de pulpa blanca los cuales son comunes en el resto de China.

II.1.2. Expansión territorial

El durazno se dispersó del oeste de China siguiendo las rutas de comercio a través de Persia. En Egipto se utilizaron como ofrendas al "Dios de la Tranquilidad" alrededor del año 1400 a.C. Fue plantado en Grecia en el año 332

a.C., y fue mencionado por Virgilio (70-19 a.C.) en la literatura Romana (Moore y Ballington, 1991). A lo largo de la ruta de distribución a través de Europa, es posible encontrar poblaciones de duraznos adaptados a condiciones locales. Entre ellos se encuentran 'Vineyard' de Francia, Rumania y Yugoslavia (Moore y Ballington, 1991).

Se les atribuye a los romanos la expansión de los duraznos a través de Europa Mediterránea y posiblemente hasta Inglaterra, en donde fue un fruto común durante el siglo XIV. Los duraznos fueron llevados del Norte al Sur de América por los primeros exploradores españoles, a través de San Agustín, Florida y México en el año 1600. Los nativos americanos dispersaron los frutos a todos los continentes (Moore y Ballington, 1991).

II.1.3. Descripción botánica

El duraznero es un árbol de 3 a 7.5 m de altura, caducifolio, de copa globosa, con tronco y ramas gruesas de corteza escamosa, de color moreno oscuro que exudan gomas al igual que las hojas. Las hojas son alternas, simples, de forma elíptica, lanceolada u oblonga, de margen aserrado o crenado, con un par de estípulas decíduas; pueden presentar glándulas en el pecíolo y en la parte baja del limbo o en los dientes de los bordes, las cuales secretan miel (INEGI, 1991).

Las flores son de color rosa, grandes, regulares, bisexuales y perígineas; las yemas florales desarrollan una sola flor y son axilares, solitarias o en pares; la floración ocurre antes de la aparición de las hojas (INEGI, 1991). El fruto es una drupa redonda, u oblonga, de piel delgada, con pubescencia fina o gruesa y mesocarpio de textura firme o blanda, gruesa y jugosa, con una sola semilla surcada; con el ápice de diversas formas, redondo, acuminado, apezonado, etc. El mesocarpio puede estar adherido al hueso ("clingstone" o hueso pegado) o estar separado de él ("freestone" o hueso despegado).

Los frutos varían en tamaño, forma, color de la piel y pulpa, siendo básicamente amarillo el color de la pulpa, exteriormente puede presentar chapeado anaranjado o rojizo; otras variedades menos comerciales son las de piel más o menos blanca al igual que el mesocarpio, su tamaño varía de 5 a 7.5 cm de diámetro (Salunke y Kadam, 1995). En la Figura 1 se presenta la imagen de frutos de la variedad 'Regio' de Michoacán, a manera de ejemplo, para observar algunas de las características que comúnmente presentan los duraznos cosechados en el centro País.



Figura 1. Características comúnmente presentadas por duraznos cultivados en el centro del País (variedad 'Regio').

II.1.4. Composición química

El componente principal de la fruta es el agua, ya sea en forma libre o ligada para mantener la turgencia de las células y de manera indirecta la textura de la fruta (Salunke y Kadam, 1995). Más de 90% del total del fruto es pulpa al llegar al estado de madurez de cosecha, con una relación pulpa/hueso de 8.5-19.5 dependiendo de la variedad (Bhargava y *col*, citado por Salunke y Kadam, 1995).

Los carbohidratos son el grupo más abundante de constituyentes y están presentes tanto como azúcares de bajo peso molecular o como polímeros de alto peso molecular. Los azúcares se encuentran en forma libre o ligada y son los constituyentes principales del durazno, su contenido depende de la variedad (Murake, 1988). La sacarosa es el principal azúcar no reductor, la glucosa y fructuosa los principales azúcares reductores, algunos otros que se encuentran en el durazno son galactosa, xilosa, glucitol, y sorbitol. Una porción de los carbohidratos se encuentra presente como fibra dietaria constituida por la celulosa, sustancias pécticas y hemicelulosas (Mourguchi y col, 1990).

Este fruto tiene un bajo contenido de proteínas y ácidos grasos, los cuales están asociados a las capas cuticulares de la superficie del fruto (Salunke y Kadam, 1995). Con respecto a los ácidos orgánicos, el ácido málico es el predominante sin embargo, los frutos tienen cantidades semejantes de ácido cítrico y quínico (Byrne, 1991). Una vez maduros se caracterizan por tener relaciones altas de °Brix/ácido; siendo las lactonas (presentes como componentes de sabor) las que contribuyen a la acidez titulable del fruto (Salunke y Kadam, 1995).

El durazno posee compuestos fenólicos que son importantes desde el punto de vista farmacológico, desarrollo de color y sabor. Entre estos se encuentran el ácido clorogénico y sus isómeros, neoclorogénico y catequina (Hulme, 1978). Los fenoles son importantes en la calidad del producto fresco y enlatado, especialmente en el color rojo del exocarpio, en la astringencia, y oscurecimiento enzimático (Luh y col., 1967 y Salunke y Kadam, 1995). En forma general se acepta que el potencial de oscurecimiento de los duraznos depende de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la fruta y de los niveles de actividad de PPO (Kader y Chordas, 1984).

El impacto visual de los carotenoides en los duraznos es la base primaria para la selección de color. El color amarillo-naranja se le atribuye principalmente a las xantofilas, mientras que el rojizo de la cáscara a las antocianinas que

principalmente se encuentran como cianidin-3-glicosidos, (Salunke y Kadam, 1995).

Los principales esterres de ácidos grasos de carotenos y carotenoides son la zeaxantina y β -criptoxantina, identificada como xantofila, licopeno y β -caroteno, mientras que β -criptoxantina, luteina y zeaxantina se identificaron como esterres de ácidos grasos del carotenol. La exposición a los rayos solares estimula el desarrollo de antocianinas, alcanzando un máximo en 8 días de exposición (Khachik y col, 1989).

La principal contribución de las frutas a la nutrición y sus productos procesados es la vitamina C cuyo contenido depende de la variedad, estado de madurez, y localización dentro del fruto (Salunke y Kadam, 1995). El Cuadro 1 presenta de manera detallada la composición química del fruto.

El fruto es muy apreciado como complemento alimenticio, se consume fresco o en conserva. Las variedades de carne blanda se prefieren para la elaboración de dulces, jugos, jaleas y mermeladas; mientras que las de carne firme son apropiadas para el envasado ya sea enteros, en mitades o en tirillas (INEGI, 1991).

Cuadro 1. Composición química aproximada del durazno.

| Constituyente | Intervalo promedio |
|---------------------------------------|--------------------|
| Humedad (%) | 86-89.1 |
| Azúcares (% peso) | |
| Totales | 7.54-8.45 |
| Reductores | 2.45 |
| No reductores | 6.35 |
| Proteínas (%) | 0.6-1.2 |
| Grasa (%) | 0.3 |
| Fibra (%) | 1.2 |
| Materia seca (%) | 12.17 |
| Acidez titulable (% ác.málico) | 0.63 |
| Energía (kcal) | 50 |
| Minerales (%) | 0.8 |
| Tiamina ($\mu\text{g}/100\text{g}$) | 0.02 |
| Riboflavina (mg/100g) | 0.04 |
| Niacina(mg/100g) | 0.5 |
| Vitamina C (mg/100g) | 1-27 |
| Minerales (mg/100g) | |
| Magnesio | 21 |
| Sodio | 2.0 |
| Potasio | 453 |
| Cobre | 0.06 |
| Azufre | 26 |
| Calcio | 15 |
| Fósforo | 41 |
| Hierro | 2.4 |
| Fenoles (g/100 g peso fresco) | 0.03-0.14 |
| Carotenoides (%) | |
| Variedades de pulpa blanca | 0.19-0.59 |
| Variedades de pulpa amarilla | 0.75-0.79 |
| Leucoantioianidinas (mg/100g) | 20.3-178 |

(Salunke y Kadam, 1995).

II.1.5. Importancia económica

II.1.5.1. Producción nacional e internacional

Los principales países productores de durazno son Italia, Estados Unidos y España con 1,860,000, 1,206,000 y 751,000 toneladas respectivamente, los cuales se presentan en la Figura 2 (Salunke y Kadam, 1995). Sin embargo en los últimos 20 años, México ha incrementado su producción junto con Grecia, Turquía y Francia (Fideghelli, 1995). En el año de 1997, se destinaron a la producción de durazno 36,857 Ha siendo los estados más destacados Chihuahua, Zacatecas, Michoacán y México (Cuadro 2), alcanzando una producción total de 128,604 toneladas (INEGI, 1998).

En el País se cuenta con una gran diversidad de materiales genéticos de este fruto, los cuales se cultivan básicamente en las zonas templadas entre los 30 y 40° de latitud norte o donde las temperaturas invernales son lo suficientemente bajas para satisfacer las necesidades de frío y permitir un follaje y floración normales en la primavera. Por hibridación se han obtenido nuevas variedades capaces de producir frutos con necesidades muy bajas de frío o con resistencia a los inviernos suaves (INEGI, 1991).

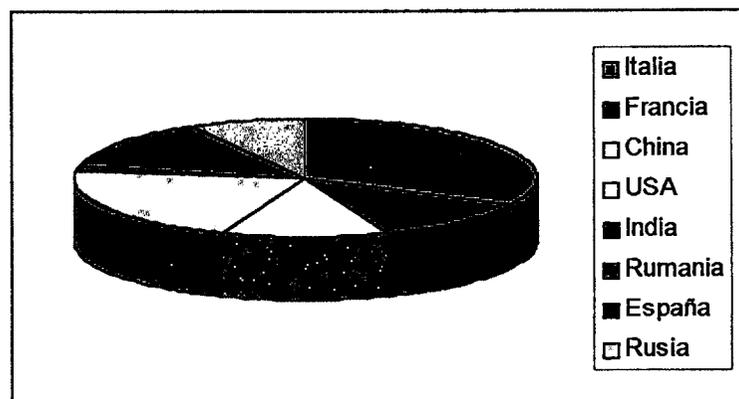


Figura 2. Principales países productores de durazno (Salunke y Kadam, 1995).

Cuadro 2. Superficie cosechada, producción y valor de la producción de durazno por Entidad Federativa, (1997).

| Entidad Federativa | Superficie cosechada (Ha) | Producción (Ton) | Valor (Pesos) |
|---------------------|---------------------------|------------------|--------------------|
| Aguascalientes | 478 | 4 727 | 25 998 027 |
| Baja California | 35 | 123 | 615 000 |
| Baja California Sur | 0 | 0 | 0 |
| Campeche | 0 | 0 | 0 |
| Coahuila | 166 | 515 | 1 370 372 |
| Colima | 0 | 0 | 0 |
| Chiapas | 870 | 3 173 | 13 065 144 |
| Chihuahua | 1 093 | 26 361 | 131 145 227 |
| Distrito Federal | 31 | 143 | 500 500 |
| Durango | 679 | 2 022 | 6 564 791 |
| Guanajuato | 143 | 797 | 3 493 378 |
| Guerrero | 1 129 | 5 155 | 13 557 650 |
| Hidalgo | 459 | 1 292 | 6 044 825 |
| Jalisco | 138 | 587 | 2 266 351 |
| México | 2 322 | 17 082 | 92 485 257 |
| Michoacán | 3 936 | 23 517 | 97 599 008 |
| Morelos | 839 | 4 647 | 16 214 916 |
| Nayarit | 134 | 290 | 666 199 |
| Nuevo León | 1 150 | 5 570 | 28 913 007 |
| Oaxaca | 949 | 2 814 | 11 256 000 |
| Puebla | 1 718 | 6 445 | 17 758 825 |
| Querétaro | 261 | 917 | 4 135 000 |
| Quintana Roo | 0 | 0 | 0 |
| San Luís Potosí | 151 | 192 | 475 512 |
| Sinaloa | 0 | 0 | 0 |
| Sonora | 170 | 781 | 6 233 175 |
| Tabasco | 0 | 0 | 0 |
| Tamaulipas | 0 | 0 | 0 |
| Tlaxcala | 236 | 1 421 | 8 696 500 |
| Veracruz | 84 | 812 | 1 218 000 |
| Yucatán | 0 | 0 | 0 |
| Zacatecas | 19 686 | 19 201 | 76 423 847 |
| Total | 36 857 | 128 604 | 566 693 517 |

INEGI, 1998.

II.1.6. Problemática mundial en poscosecha

II.1.6.1. Oscurecimiento enzimático en duraznos para venta en fresco

El durazno, es considerado uno de los frutos más susceptibles al estrés por frío y mecánico, siendo este último el principal factor en la disminución de su venta en fresco en años recientes (Vergano y *col.*, 1995).

Crisosto y *col.*, (1991, 1992 y 1993) señalaron que el oscurecimiento de la cáscara de duraznos y nectarinas es una alteración que se ha presentado en las principales zonas de producción en Estados Unidos, siendo uno de los mayores defectos cosméticos que afectan su apariencia visual y por lo tanto limita su venta para consumo en fresco. Estas alteraciones se presentan comúnmente en la empacadora y después del transporte y almacenamiento, pero su origen puede incluir también la cosecha y selección.

El oscurecimiento de la cáscara está asociado con el daño mecánico ocasionado durante el manejo y transporte de los frutos. Un estudio anatómico realizado por Crisosto y *col.*, (1993), mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido en duraznos y nectarinas, demostró que la abrasión es el daño físico asociado al oscurecimiento de la cáscara, ya que las células de la epidermis con manchas oscuras, sufrieron una ruptura, mientras que las células no oscurecidas y las de tejido fresco se encontraron intactas.

Por ser un fruto climatérico, el durazno comúnmente se cosecha antes de llegar a su estado de madurez de consumo para reducir el magullamiento, y de esta manera prolongar su vida de anaquel (Martínez-Romero y *col.*, 2000). Sin embargo, se deteriora rápidamente a temperatura ambiente (alrededor de 20°C), por lo que debe almacenarse a baja temperatura (0-2°C), pero existen algunas variedades que son susceptibles al daño por frío, el cual se manifiesta como falta de jugosidad, oscurecimiento de la pulpa y pérdida de capacidad para madurar,

estos síntomas se desarrollan después de un periodo breve de almacenamiento frío (3-4 semanas a 0°C), y no se manifiestan hasta que los frutos son transferidos a temperatura ambiente (Crisosto y col., 1999).

Esta problemática es común en todas las zonas de producción de durazno, y nuestro país no es la excepción, siendo ésta la principal razón para abordar el tema, ya que en diversos estados de la República, (por ejemplo, Michoacán y Aguascalientes) se tienen importantes pérdidas por efecto del oscurecimiento enzimático como consecuencia principalmente de daño mecánico y daño por frío, sin embargo es prácticamente imposible encontrar estadísticas nacionales referentes a este hecho.

II.2. Oscurecimiento enzimático (principales variables asociadas)

II.2.1. Compuestos fenólicos

II.2.1.1. Generalidades

Se considera que el paso fundamental en el oscurecimiento enzimático es la oxidación de los fenoles, reacción catalizada por PPO, a partir de la que se forman quinonas, las que en reacciones subsecuentes formarán productos coloridos. Estas quinonas son oxidantes poderosos, susceptibles a oxidar otros compuestos y se pueden reducir al fenol original. Pero también pueden reaccionar con compuestos nucleofílicos incluyendo tioles, aminas, y otros fenoles. Algunos de los productos de reacción secundarios son coloridos o pueden ser oxidados a formas quinoidales coloridas. Por lo tanto el oscurecimiento resultante de la oxidación enzimática, depende también de las reacciones subsecuentes (Cheynier y col., 1995).

El grado en que los fenoles contribuyen al oscurecimiento enzimático de las frutas y vegetales, depende de su localización y concentración, de la naturaleza de los

demás sustratos en el tejido, así como de la intensidad del color de los pigmentos macromoleculares obtenidos a partir de las diferentes quinonas. Respecto de su localización, en frutos y vegetales la concentración de fenoles es mayor en las capas externas; por ejemplo, las manzanas y peras contienen en la cáscara mayor cantidad de fenoles que en la pulpa, y en cuanto a su concentración, los frutos pequeños tienen mayor contenido de fenoles que los grandes, y ésta es mayor en las manzanas de invierno que las de verano u otoño (Vamos-Viyázó, 1981). Estos aspectos manifiestan la complejidad que representa el proceso de oscurecimiento.

II.2.1.2. Función en la naturaleza

No obstante la problemática que manifiestan, los fenoles son de gran importancia como materiales celulares de soporte; forman una parte integral de las estructuras de la pared celular, principalmente en materiales poliméricos, como ligninas y suberinas para el soporte mecánico y barreras contra la invasión microbiana, además de su importancia en la formación de vasos de conducción o haces vasculares. Las ligninas, son después de la celulosa, las estructuras orgánicas más abundantes sobre la Tierra. Los flavonoides también son de gran importancia ecológica, ya que sus colores contribuyen o facilitan el proceso de polinización de las flores y la dispersión de las semillas contenidas en los frutos (Strack, 1997). Algunos de ellos se pueden acumular como compuestos inducibles de bajo peso molecular, los cuales reciben el nombre de fitoalexinas, son compuestos antimicrobianos que se generan como resultado de haber sometido un tejido vegetal a una situación de estrés como ataque de patógenos, heridas, baja temperatura, etc, (Dixon y Paiva, 1995). Sin embargo las funciones de las fitoalexinas se han postulado basadas sólo en evidencias de correlación y en muy pocos casos estas funciones han sido rigurosamente probadas. Algunos ejemplos de estos compuestos son las cumarinas, furanocumarinas, flavanoles, etc, (Dixon y Paiva, 1995).

II.2.2. Enzimas oxidorreductasas

El proceso de oscurecimiento que se presenta en frutas y hortalizas en producto fresco está directamente relacionado con la actividad de las enzimas oxidorreductasas. A continuación se dará una descripción de las dos consideradas como más importantes dado éste fenómeno: polifenoloxidasas y peroxidasa.

II.2.2.1. Polifenoloxidasas (PPO)

A ésta enzima se le considera como la principal responsable del oscurecimiento enzimático, por sus funciones es conocida como catecolasa, tirosinasa, fenolasa o polifenoloxidasas (E.C. No. 1.10.3.1); estructuralmente PPO, contiene cobre y cataliza dos diferentes tipos de reacción (Figura 3); la hidroxilación de los monofenoles a o-difenoles y la deshidrogenación de o-difenoles a o-quinonas (Whitaker y Lee, 1995). Estas dos actividades enzimáticas se conocen como monofenolasa (hidroxilasa o cresolasa) y difenolasa (catecolasa u oxidasa); respectivamente (Robb, 1984). La relación de actividades de difenolasa a monofenolasa varía dependiendo de la planta, aunque la difenolasa muestra una actividad 5 a 10 veces mayor que la actividad monofenolasa (Robinson y Eskin, 1991).

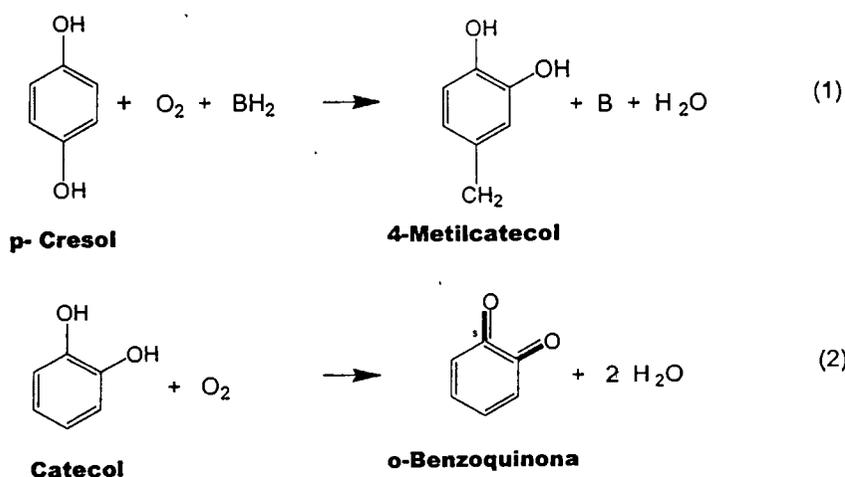


Figura 3. Reacciones catalizadas por PPO, (1) Hidroxilación de un monofenol a o-difenol, (2) Deshidrogenación de un o-difenol a o-quinona.

II.2.2.2. Presencia y distribución en células de plantas

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal y animal y no esta restringida a un órgano en particular pero su acción depende de la especie, variedad, y estado de madurez (Vámos-Vigyázó, 1981). Su actividad es muy baja en plantas jóvenes, en las que se encuentra estrechamente ligada a la membrana, mientras que la cantidad de formas solubles se incrementa conforme la planta envejece (Meyer y Biehl, 1980); o también después de haber sufrido golpes o magulladuras (Robinson y Eskin, 1991). Sin embargo, se sabe que PPO es una enzima intracelular localizada en cloroplastos, mitocondrias, microsomas, peroxisomas y plasma celular (Kato y col., 1976; Henry y col., 1982; Robinson y Eskin, 1991).

II.2.2.3. Posible función de PPO en la naturaleza

Se han desarrollado varias hipótesis acerca de las posibles funciones o papel biológico de esta enzima, una de ellas es su participación en la respiración como una oxidasa terminal. Otra de sus posibles funciones, es su participación en la fosforilación pseudocíclica o "Reacción de Mehler", un sistema de transporte de electrones no cíclico que involucra al oxígeno en lugar de NADP^+ como aceptor final (Tolbert, 1973; Robinson y Eskin, 1991); también se le ha asignado como integrante del mecanismo de resistencia contra el ataque de virus, bacterias, hongos así como daño mecánico, ya que la activación de esta enzima debido a la presencia de una infección o inducida por daño mecánico dará como resultado la formación de quinonas y de manera consecuente de polímeros insolubles que proporcionan una barrera para evitar que la infección se expanda en la planta (Robinson y Eskin, 1991); estos mismos autores señalan que algunos de los productos intermedios formados durante la polimerización de los fenoles pueden inactivar o unirse a los virus de las plantas y limitar su potencial de infestación.

Otra de sus posibles funciones biológicas es la formación y desarrollo de raíces, así como en la biosíntesis de otros fenoles de las plantas, como fenilpropanoides y de manera indirecta en la formación de lignina (Robb, 1984).

II.2.2.4. Peroxidasa (POD)

Otro factor considerado como un posible elemento del oscurecimiento es la actividad de la enzima peroxidasa (E.C. 1.11.1.7), la cual forma parte del grupo de enzimas denominadas oxidorreductasas encontrándose ampliamente distribuidas en el reino vegetal y animal; éstas enzimas son hemoproteínas que tienen como grupo prostético a la protoporfirina IX.

En frutas y hortalizas se encuentran en una gran variedad de isoformas, que difieren en P.M. y p.I., las cuales pueden ser separadas por electroforesis (específicamente electroforesis de enfoque isoelectrico) y detectadas mediante una tinción específica con un sustrato dado los productos coloridos que se obtienen de su acción.

La peroxidasa es una enzima capaz de convertir los o-difenoles a o-quinonas en presencia de peróxido de hidrógeno (Robinson y Eskin, 1991). Al parecer están localizadas en casi todas las partes y organelos de la célula, aún cuando varían en número y actividad con los cambios fisiológicos y condiciones ambientales (Hendriks y col., 1985; Ros Barcelo y col., 1987). Se ha aceptado, que se encuentran principalmente localizadas en las paredes celulares, citoplasma y vacuolas, aún cuando existe poca unanimidad sobre la localización individual de las isoperoxidasas en las células de plantas (Robinson y Eskin, 1991).

II.2.2.5. Mecanismo de reacción de POD

Estas enzimas pueden promover un gran número de reacciones separadas y por lo tanto tienen un alto grado de versatilidad, no presentado por ninguna otra enzima. Pueden catalizar reacciones de peroxidación, oxidación e hidroxilación; sin embargo, por lo general catalizan reacciones de peroxidación, para lo cual requieren un sustrato oxidante y un sustrato reductor, siendo el sustrato oxidante generalmente el peróxido o un ácido peróxido, ROOH. A continuación se presenta el mecanismo para esta reacción (Robinson y Eskin, 1990):

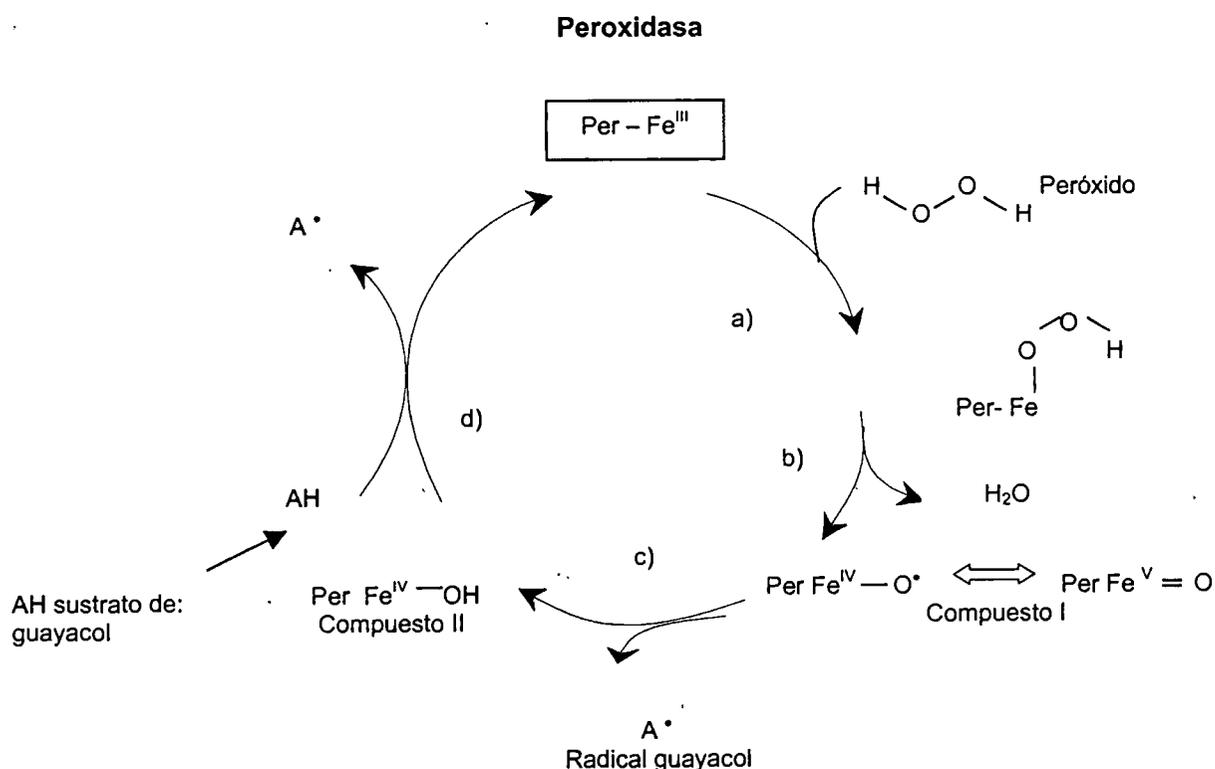
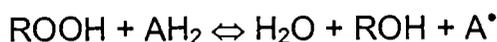
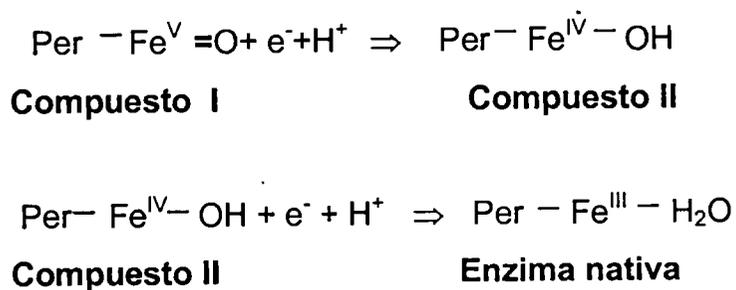


Figura 4. Mecanismo cíclico de reacción de POD, utilizando guayacol como sustrato donador de electrones (Robinson y Eskin, 1991).

En la figura 4, se observa en el paso a - b, que se une el grupo hemo de la peroxidasa con el peróxido para formar el compuesto I, el cual tiene una estructura tipo ferrilo con un átomo de oxígeno obtenido del peróxido. Las peroxidasa efectúan la unión heterolítica de los puentes O-O, por lo que el compuesto ferroso pasa a su estado de oxidación +5, ya que el peróxido remueve los dos electrones del átomo de hierro de la enzima. En el paso c, se lleva a cabo la reducción del compuesto I a II por medio de un sustrato reductor (guayacol), y por último en d, se reduce el compuesto II para reformar la enzima nativa a su estado de oxidación +3.

De manera que en la oxidación inicial (paso a) el sustrato donador (AH₂) produce un radical libre(A*) (Figura 4). El peróxido de hidrógeno es generalmente el sustrato oxidante (ROOH). El compuesto I se reduce por la subsecuente adición de dos electrones para formar peroxidasa nativa: La reducción del compuesto II resulta de la recuperación de la peroxidasa nativa en su estado de oxidación +3. En condiciones en las cuales, no se encuentra en concentraciones adecuadas el donador de hidrógeno, se pasa del compuesto II al compuesto III., que es una forma inactiva e irreversible de la enzima.



La reacción involucra un ciclo de oxidación y recuperación de la enzima (Figura 4), (Robinson y Eskin, 1991).

II.2.2.6. Función en la naturaleza

Se desconoce su función en la naturaleza de cada una de las isoperoxidasas, aunque existen numerosos reportes en la literatura de Fisiología de plantas de su participación específica en la biosíntesis de lignina (Biggs y Fry, 1987), oxidación del ácido indolacético (Palmieri y *col.*, 1978), maduración de frutos y protección contra el ataque de hongos y bacterias (Miller y *col.*, 1989). En los productos cosechados se cree que las peroxidases son las responsables de la pérdida de color, sabor y textura así como de atributos nutricionales. El estrés fisiológico, las heridas, la infección por hongos e infecciones virales ocasionan la expresión de diferentes isoperoxidasas, pero, no se ha esclarecido completamente su expresión en cada una de las reacciones catalizadas por estas enzimas. En la industria se le ha involucrado en la pérdida de sabor de productos hortícolas congelados y enlatados, debido a que tienen la capacidad de regenerar su actividad después del tratamiento térmico (Vámos – Vigyázó, 1981).

II.2.2.7. Relación con el oscurecimiento enzimático

Se ha considerado la posible contribución de POD en el proceso de oscurecimiento enzimático por diversos investigadores entre los que se encuentran Burnette, (1977); Williams y *col.*, (1985), Nicolas y *col.*, (1994); quienes consideran que una gran cantidad de compuestos fenólicos pueden ser oxidados formándose una gran diversidad de productos tales como los hidroxibenzoatos.

Los mono, dihidroxifenoles y compuestos complejos tales como el ácido clorogénico, son sustratos potenciales para las peroxidases, además de los flavonoides a partir de los cuales se forman varios productos (Schreier y Miller, 1985). Las peroxidases también pueden catalizar reacciones de polimerización de flavonoides una vez que estos han sido oxidados, una manifestación de este proceso es la presencia de "sustancias oscuras" poliméricas en tejidos dañados ya

sea por el ataque de patógenos o senescencia (Strack, 1997). A este respecto no se ha definido completamente la función de los productos del oscurecimiento como parte del sistema de defensa.

Richard-Forget y Gaillard, (1997), demostraron la participación de POD en el oscurecimiento de pera; identificando la participación conjunta de PPO y POD en la oxidación de algunos compuestos fenólicos como el 4-metilcatecol, ácido clorogénico y epicatequina demostrando que las quinonas formadas por PPO fueron utilizadas por POD como sustrato de peróxido, y por lo tanto concluyeron, que POD en presencia de PPO, aumenta la degradación de fenoles.

Feippe y *col.*, (2001), trabajaron con duraznos almacenados en refrigeración en atmósfera de aire, determinaron que las actividades de PPO y POD mostraron una correlación positiva con el oscurecimiento interno.

De acuerdo a estos antecedentes; se puede constatar que el proceso de oscurecimiento tiene una gran importancia desde el punto de vista de calidad del producto, pero que todavía no existe un claro entendimiento del mismo y que por lo tanto son muy necesarios los trabajos de mejoramiento genético para encontrar variedades con mayor tolerancia a este factor, pero además es necesario tener un conocimiento más profundo del proceso con el fin de establecer de que forma podrían estar interrelacionados los diferentes factores que generan el oscurecimiento.

II.3. Métodos de prevención del oscurecimiento enzimático

A manera de dar una solución parcial e inmediata al problema del oscurecimiento, muchos investigadores han estudiado el aplicar diferentes compuestos que eliminen o eviten las reacciones de oscurecimiento.

II.3.1. Principios de la prevención del oscurecimiento

Uno de los procedimientos más utilizados en la prevención del oscurecimiento enzimático, es el uso de agentes antioscurecimiento, siendo reportados el ácido ascórbico, 4-hexilresorcinol, cloruro de sodio, cisteína, entre otros; como los más efectivos en la inhibición de PPO. Sin embargo, no existen reportes en los que se realice de manera conjunta estudios de inhibición de PPO y POD, lo que sería de gran utilidad, debido a que la peroxidasa, al parecer también es una enzima clave en la manifestación del proceso de oscurecimiento.

Los principios de la prevención del oscurecimiento no han cambiado con el tiempo y son esencialmente los mismos a los aplicados en la inhibición de la enzima en cualquier tejido, por ejemplo:

- a) inhibición/inactivación de la enzima
- b) eliminación/ transformación de sustrato(s).
- c) combinación de a y b

En el Cuadro 3 se presentan algunos inhibidores de las enzimas o-difenoloxidasas (DPO) agrupados de acuerdo a su modo de acción, aún cuando algunos compuestos pueden pertenecer a más de un grupo. La inhibición se puede efectuar por quelación de un grupo prostético, competición por sustrato o interacción con los productos de reacción (Walker, 1995).

Cuadro 3. Clasificación de inhibidores de las enzimas o-difenoloxidasas.

| Inhibidores de DPO | |
|--|--|
| Grupo I. Agentes reductores | Ácido ascórbico, SO ₂ , Metabisulfito de sodio, Tioglicolato, 2-Mercaptobenzotiazol, Mercaptoetanol |
| Grupo II. Agentes quelantes de Cu | DIECA, Tropolone, Metimazol, Monóxido de carbono |
| Grupo III. Acopladores de quinona | Cisteína, Glutathion, Penicilamina, Ácido bencensulfónico |
| Grupo IV. Sustratos análogos | Ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico |
| Grupo V. Misceláneos | PVP, 4-Hexilresorcinol |

* DIECA= dietilditiocarbamato, SO₂ = dióxido de azufre, PVP = polivinilpirrolidona Walker, (1995).

II.3.1.1. Métodos químicos

II.3.1.1.1. Inhibición por agentes reductores

Probablemente es el método más común para controlar el oscurecimiento enzimático tanto en la industria como en el laboratorio, se debe a la adición de agentes reductores como el dióxido de azufre, metabisulfito y ácido ascórbico, siendo este último uno de los compuestos naturales más ampliamente utilizado como inhibidor del oscurecimiento, ya que por sus efectos a la salud, los sulfitos se han prohibido en varios países. Estos compuestos previenen el oscurecimiento reduciendo las quinonas formadas a su forma de o-difenoles, por lo tanto se consumen durante el proceso. Aún cuando el metabisulfito puede actuar como un agente reductor también puede reaccionar con los intermediarios de la quinonas para formar sulfoquinonas e inhibir de manera reversible a las DPOs (Walker, 1995).

En contraste los compuestos -SH se pueden combinar químicamente con las o-quinonas para formar un producto estable e incoloro que evitara de manera permanente futuras oxidaciones (por ejemplo la cisterna). Sin embargo, estos tioles sólo se pueden combinar con o-quinonas cuando la relación molar excede

un valor crítico (1.5:1), por lo tanto una vez que se excede este valor se pretendería tener una protección permanente (Walker, 1995).

II.3.1.1.2. Inhibidores poliméricos de difenoloxidasas

Durante la década de los ochenta varias formas de polivinipirrolidona (PVP y PVPP) se utilizaron en la extracción de enzimas de plantas debido a su capacidad para inhibir el oscurecimiento enzimático. Con PVP (PM 10-60 kDa) dos procesos parecen estar involucrados, el primero es que actúa como inhibidor competitivo de o-DPO pero también puede formar complejos con fenoles de bajo peso molecular; pero aún no está claro el mecanismo exacto. PVPP (Poli-Clair AT un grado de PVP insoluble y con peso molecular alto), probablemente previene el oscurecimiento debido a que los compuestos fenólicos se unen firmemente a este polímero y son removidos del sistema de reacción.

II.3.1.1.3. Polipéptidos inhibidores de polifenoloxidasas

Walker (1995), reportó que el hongo *Dactylium dendroides* secreta un inhibidor de galactosa oxidasa y que este péptido pequeño inhibe la actividad de catecolasa en manzana. De manera más reciente se reportó que *Lactobacillus helveticus* secreta un ciclotetrapeptido que inhibe la actividad de o-DPO. De acuerdo con este autor, aún no se ha evaluado la seguridad y utilidad de estos péptidos para controlar el oscurecimiento enzimático.

II.3.1.1.4. Inhibición de o-DPO por sustratos análogos

Se ha encontrado que varios ácidos cinámicos son potentes inhibidores de PPO de manzana y su acción inhibitoria decrece en el siguiente orden: ácido cinámico > ácido p-cumárico > ácido ferúlico > ácido m-cumárico > ácido o-cumárico > ácidos

benzoicos. Esto parece deberse a la presencia o ausencia de cadenas insaturadas, ya que los ácidos dicarboxílicos insaturados con al menos dos doble enlaces conjugados, como el ácido sórbico, son buenos inhibidores de PPO. El 4-hexil-resorcinol es uno de los compuestos descubiertos recientemente, patentado y aprobado como inhibidor, es efectivo, seguro y económico (Lambrecht, 1995).

II.3.1.2. Métodos físicos para evitar el oscurecimiento enzimático

Así como la inhibición enzimática se puede llevar a cabo mediante el empleo de productos químicos también se puede efectuar mediante métodos físicos, estos últimos producen inhibición irreversible, mientras los químicos generan inhibición reversible o irreversible.

II.3.1.2.1. Tratamiento térmico

Las inmersiones en agua caliente se han utilizado para evitar el oscurecimiento en camote que es destinado a la congelación. Un tratamiento de escalde a 100°C durante 3 min o a 94°C durante 5 min da resultados satisfactorios sin la reducción del contenido de fenoles. El blanqueo en agua hirviendo se utiliza también para preservar el color verde en pimienta. Tiempos superiores a 15 minutos dan como resultado una mejor retención de color en cerezas. El calentamiento con microondas combinado con escalde es más eficiente en la inhibición enzimática y permite reducir los tiempos de tratamiento (Vámos-Vigyázó, 1995). No obstante, estos métodos no son aplicados para los productos comercializados en estado fresco.

II.3.1.2.2. Sonicación

Se han realizado estudios para combinar el tratamiento térmico con ondas ultrasónicas para reducir la resistencia de PPO de hongos al calor. Las aplicaciones simultáneas de calor y ondas ultrasónicas tienen un efecto sinérgico

en la inactivación de la enzima. El proceso denominado manotermosonicación necesita, sin embargo, equipo especial y probablemente caro y solo se podría utilizar en productos que se dañan por un drástico tratamiento térmico (Chen y col., 1992).

II.3.1.2.3. Dióxido de carbono supercrítico

Se ha intentado inactivar la actividad de PPO en cáscara de papa, langosta y camarón, utilizando un tratamiento con Dióxido de Carbono Supercrítico (SC-CO₂). Las preparaciones de enzima purificada presentaron ligeras pérdidas de actividad cuando se calentaron a 43°C durante 30 minutos (5% en la PPO en cáscara de papa). El tratamiento de las mismas con alta presión de CO₂ (58 atm) ocasionó importantes pérdidas de actividad después de 1 minuto, la actividad residual de PPO de papa (la más resistente de las tres) fue sólo 45%, sin embargo después de 30 minutos la pérdida de actividad fue de 91%. Aunque ésta se recuperó en un 28% después de las primeras 2 a 6 semanas de almacenamiento en congelación, con una disminución conforme transcurrió el tiempo (López y col., 1994).

Los tratamientos físicos, involucran el empleo de calor, esto restringe su aplicación a productos cocinados, fritos, etc. Además la mayoría requiere equipo sofisticado, y parecería, especialmente para el caso de frutas, que la inhibición con químicos juega un papel primordial en la prevención del oscurecimiento enzimático, al menos a corto plazo. Sin embargo, los aditivos se consideran indeseables en los alimentos por razones de salud, por lo que este campo de investigación seguirá siendo abordado (Vámos-Vigyázó, 1995).

II.4. Prevención del oscurecimiento en durazno

II.4.1. Investigaciones desarrolladas en la actualidad

Debido a que se piensa que el grado de oscurecimiento que se presenta entre las variedades de durazno, se debe a diferencias en el contenido de compuestos fenólicos y al nivel de actividad de PPO, las investigaciones desarrolladas hasta el momento para evitar el oscurecimiento enzimático, se basan en la inhibición de la actividad de PPO o en la interacción con los reactantes (sustratos y/o quinonas), de tal forma que se bloqueen los eventos posteriores que conducen al oscurecimiento.

Por ello, el empleo de diversos compuestos (por ejemplo: inhibidores competitivos de PPO o acopladores de quinonas), como anteriormente se mencionó, es uno de los métodos más ampliamente utilizados ya que además de inhibir el oscurecimiento, se consideran seguros y/o económicos para ser empleados por los procesadores de alimentos. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son: 4-hexil-resorcinol, tropolone (2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1-uno) y ácido ascórbico (Vámos-Vigyázó, 1995). En 1994 este mismo autor, realizó algunos estudios en rebanadas de durazno de la variedad 'Elberta' y 'Ford', tratados y no tratados con ácido ascórbico, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición con respecto a los frutos control (Cuadro 4). Si bien los porcentajes de inhibición son altos para muchos de estos compuestos no se debe olvidar la limitante de su aplicación en producto intacto.

No obstante, dada la ya mencionada complejidad del problema de oscurecimiento, sería de gran utilidad el emplear algunos de los inhibidores de oscurecimiento reportados en la literatura, en frutos de durazno del País con el fin de encontrar una posible solución parcial o cuando menos atenuar este problema.

Cuadro 4. Efecto de distintos inhibidores del oscurecimiento en duraznos de la variedad 'Elberta'(E) y 'Ford'(F).

| Variedad | Inhibición y Concentración (%) | Tiempo tratamiento (min) | Inhibición relativa (%) |
|----------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| E | AA(1) | 1 | 85 ± 33* |
| E | AA(3) | 1 | 100 |
| F | | 1 | 100 |
| E | CA(1) | 1 | 30 ± 6 |
| E | CA(3) | 1 | 39 ± 12 |
| E | | 2 | 42 ± 13 |
| E | CA(5) | 2 | 71 ± 19 |
| E | Sacarosa (30) | 2 | 64 ± 8 |
| F | | 1 | 82 ± 21 |
| E | Sacarosa (50) | 2 | 62 ± 10 |
| E | Sacarosa (30)+ CA (3) | 2 | 100 |
| E | Sacarosa (50) + CA (3) | 2 | 100 |
| E | NaHSO ₃ (0.1) | 2 | 100 |

E: Elberta; F: Ford : AA: ácido ascórbico; CA: Ácido cítrico
 * no estadísticamente significativo del 100% de inhibición

Otros investigadores se han enfocado al mejoramiento de técnicas de detección, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos; que tiene como uno de sus principales objetivos, el conocer el fenol o fenoles que más contribuye(n) al oscurecimiento. Una vez hecho esto, se pretende seleccionar las variedades con bajo contenido de fenoles, y cultivar principalmente aquellas variedades que presenten ésta característica; aun cuando es importante considerar también la actividad de PPO. Lee y col., (1990), realizaron la identificación de compuestos fenólicos en 15 cultivares de durazno cosechados en el estado de Nueva York, E.U., siendo los principales fenoles identificados, catequina, procianidina B3, ácido clorogénico, neoclorogénico, y cafeico, concluyendo que el grado de oscurecimiento estuvo estrechamente correlacionado con el contenido de fenoles. Cheng y Crisosto (1995), realizaron estudios de 6 variedades, en los que determinaron el potencial de oscurecimiento, la composición de fenoles y la actividad de PPO en extractos de cáscara de durazno y nectarinas, y señalaron al ácido clorogénico y actividad de PPO, como los factores responsables del oscurecimiento enzimático.

No obstante estos estudios, no debe olvidarse que una de las mejores alternativas para evitar el oscurecimiento, es el mejoramiento genético, área de la investigación en donde se tienen numerosos avances para disminuir la expresión de PPO en manzanas, plátanos, hongos, duraznos y otras plantas (Whitaker y Lee, 1995).

Respecto al oscurecimiento, en México son muy escasos los trabajos de caracterización de variedades de durazno; González-Rodríguez, (1999), evaluó 38 genotipos de este fruto (procedentes de Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas, Michoacán y Puebla) en cuanto a características físicas y químicas; asimismo realizó la determinación cualitativa de la actividad de PPO y contenido de fenoles, y mediante la suma de éstas dos últimas evaluaciones determinó la susceptibilidad al oscurecimiento en epidermis y pulpa de todos los cultivares, esto hizo posible la identificación de genotipos con bajo nivel de oscurecimiento y mejores características físicas y químicas, siendo las variedades seleccionadas buenos prospectos para el mejoramiento genético.

Dada la importancia de los compuestos fenólicos y la actividad de PPO en el oscurecimiento enzimático y por consecuencia en el deterioro del durazno, el trabajo anteriormente mencionado representa una información muy valiosa, aún cuando se podría considerar de cierto modo subjetiva y sería necesario realizar un estudio cuantitativo de estas variables, así como adicionar otras mediciones, que nos provean de información más completa que pudieran dar marcos de referencia que permitan hacer una selección de materiales genéticos menos susceptibles a oscurecer y con ello apoyar al programa de mejoramiento genético.

III. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta al estrés mecánico y de temperatura sobre las principales variables involucradas con el oscurecimiento enzimático de los principales cultivares de durazno del centro del país.

III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar diferentes variedades de durazno cultivados en Aguascalientes, Michoacán y Querétaro en cuanto a su actividad de PPO, contenido de fenoles y flavonoides.
- ❖ Examinar el efecto del estrés de temperatura y daño mecánico sobre la actividad de las enzimas PPO y POD.
- ❖ Determinar el efecto del estrés mecánico y de temperatura sobre el contenido y composición de fenoles.
- ❖ Determinar el contenido de flavonoides en frutos sometidos a daño mecánico y daño por frío.
- ❖ Medir la permeabilidad de membrana en frutos con daño mecánico y daño por frío.
- ❖ Evaluar harinosidad en duraznos con daño mecánico y daño por temperatura.
- ❖ Correlacionar estadísticamente, el grado de asociación entre las variables en dos cultivares y tratamientos.
- ❖ Evaluar el efecto de algunos agentes antioscurecimiento, así como del tratamiento térmico sobre la actividad de PPO y POD en cultivares de durazno de Aguascalientes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Material biológico

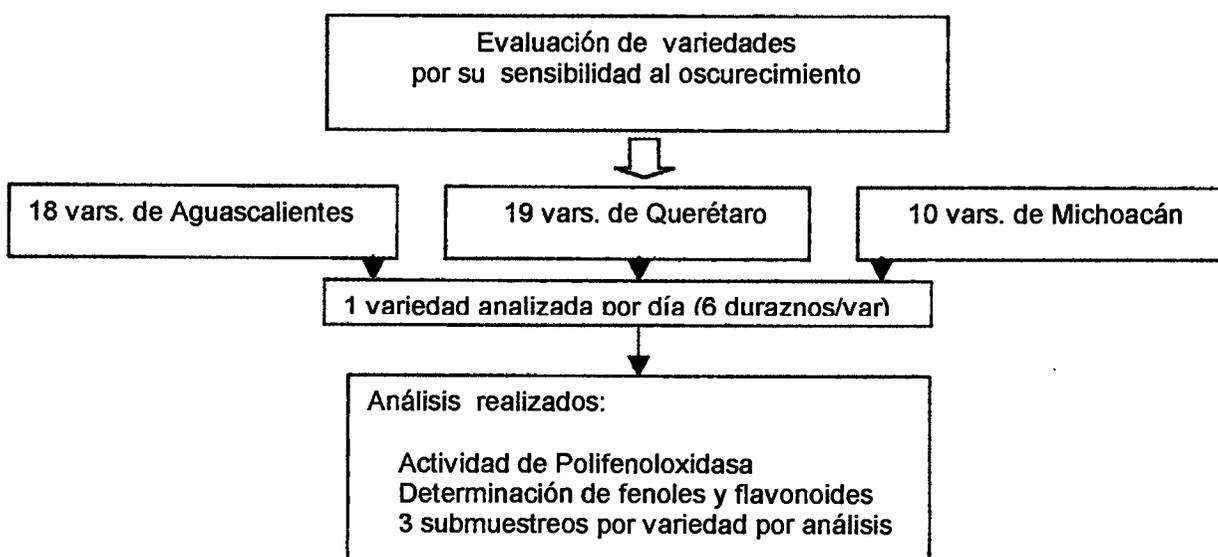
IV.1.1. Origen geográfico de los cultivares

Se trabajó con 47 cultivares de durazno, 10 provenientes del Estado de Michoacán, 18 de Aguascalientes y 19 de Querétaro. Todos los frutos fueron de pulpa firme y hueso pegado; estos se cosecharon manualmente y se transportaron a temperatura ambiente, una vez en el laboratorio se almacenaron en una cámara de refrigeración a 5°C, en donde permanecieron una noche, para efectuar la asignación de experimentos y la realización de los análisis al día siguiente.

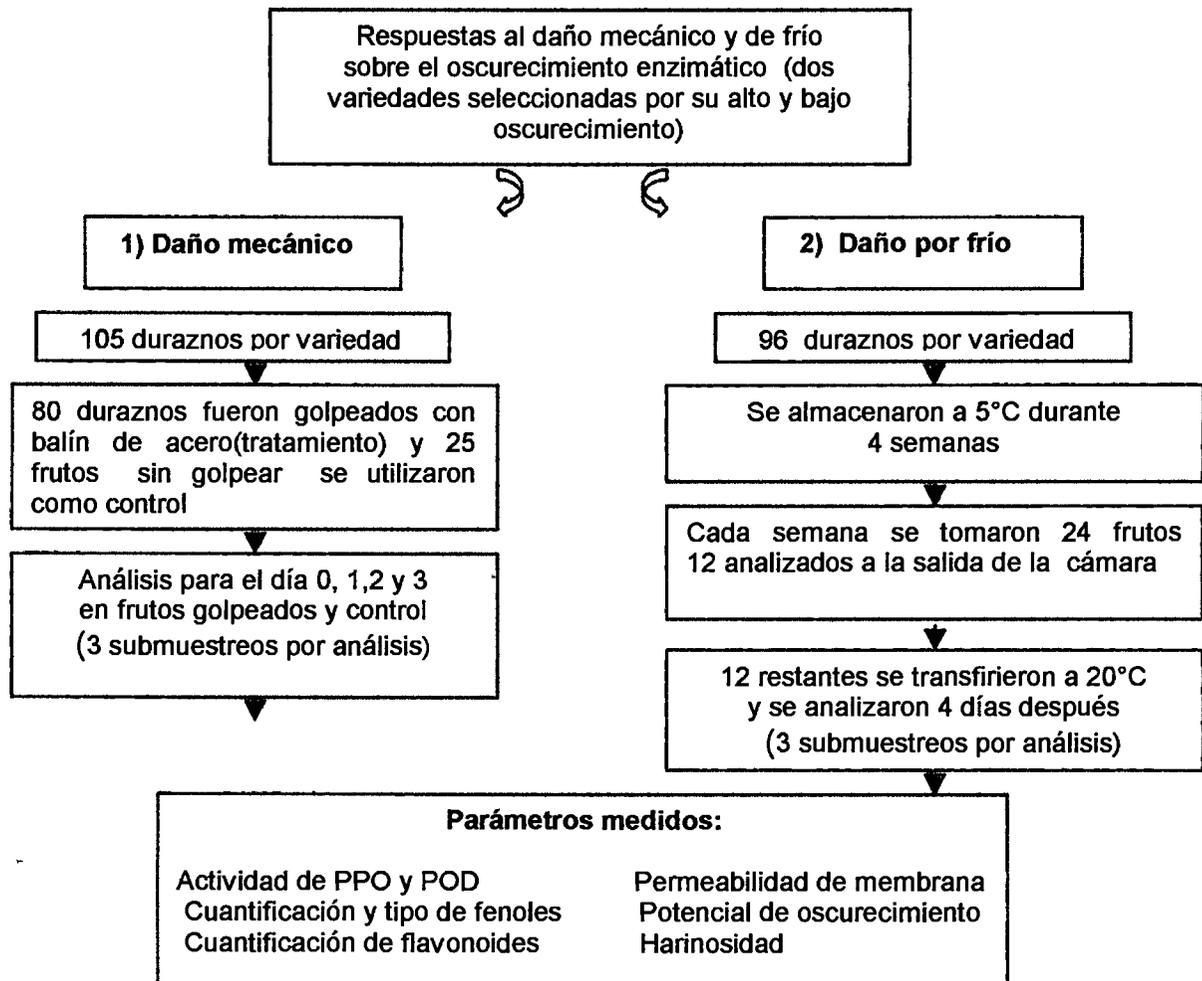
IV.2. Estrategia Experimental

El trabajo experimental se realizó en tres etapas, que se muestran en los siguientes esquemas:

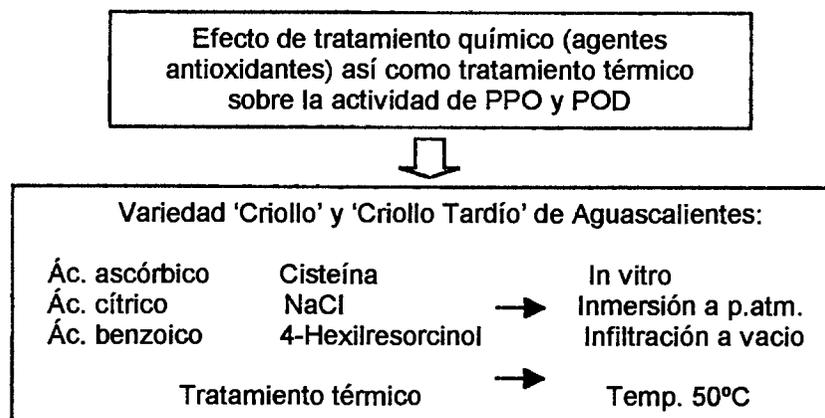
Primera Etapa:



Segunda Etapa:



Tercer Etapa:



Durante la primera etapa se caracterizaron las variedades basándose en las principales variables asociadas con el oscurecimiento enzimático (actividad de polifenol oxidasa, contenido de fenoles totales y de flavonoides), y en la segunda se aplicaron tratamientos de daño mecánico y daño por frío sólo en dos cultivares contrastantes en cuanto a su potencial de oscurecimiento para observar el comportamiento de las variables por efecto de tratamiento, etapa en la que se incrementaron el número de variables a determinar incluyéndose la medición de actividad de peroxidasa (POD), conductividad y harinosidad.

IV.2.1. Preparación de los frutos

Los frutos después de cosechados se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Química de la UAQ; donde se almacenaron durante una noche a 5°C con el objeto de eliminar el calor de campo. A las 24 horas, se seleccionaron frutos firmes de aproximadamente el mismo tamaño, sin manchas y sin daño mecánico. Se lavaron con agua de grifo para eliminar polvo y posibles insectos, se dejaron escurrir y posteriormente fueron sumergidos en una solución con fungicida Promil® a una concentración de 200 ppm del principio activo (Benomil 50%).

IV.3. Métodos empleados

IV.3.1. Determinación de las principales variables asociadas con el oscurecimiento enzimático

IV.3.1.1. Actividad de polifenol oxidasa (PPO)

Dado que los procesos de oscurecimiento en fruto intacto; son perceptibles sobre la superficie de los frutos se decidió analizar si había diferencia en la actividad de PPO ubicada en la piel respecto de aquella encontrada en la pulpa. Para resolver este aspecto, se llevaron a cabo análisis previos con muestras de la variedad

'S.J.A.Soto' proveniente del Estado de Michoacán. Debido a la imposibilidad de obtener la cantidad de muestra necesaria de cada fruto, se mezclaron pieles de los diferentes frutos. Los resultados fueron comparados con aquellos encontrados en la pulpa interior de los frutos muestreados.

A 5 g de las pieles de 6 frutos o de la pulpa interior de cada uno de ellos, se les adicionaron 1.25 g de polivinilpirrolidona (PVPP), y 20 ml de solución amortiguadora de McIlvaine (Ácido cítrico-Fosfato de potasio monobásico) pH 6.2; se homogeneizó durante 1 minuto en un homogeneizador ULTRA TURRAX T-25 a máxima velocidad (9 500 rpm), se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos y 4°C; el filtrado se consideró como el extracto enzimático crudo para realizar las determinaciones.

La actividad enzimática se realizó de acuerdo a Montgomery y Sgarbieri, (1975), brevemente consistió en colocar en celdas del espectrofotómetro de 3 ml, 1820 µl de solución amortiguadora (McIlvaine) pH 6.2; 210 µl de catecol 0.1 M y 70 µl del extracto enzimático, se leyó la absorbancia a 420 nm y 25°C durante 3 minutos. La actividad de la enzima se expresó como unidades de actividad enzimática por gramo de peso fresco del tejido (UA/gpf), definiéndose una unidad de actividad como el cambio de 0.001 unidades de absorbancia por minuto; finalmente se expresó en la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de PPO (UA / gpf)} = \frac{\text{Lectura} * 1000}{0.0175}$$

IV.3.1.2. Actividad de peroxidasa (POD)

La actividad de POD se midió de acuerdo con el método descrito por Childs y Bardsley, (1975), utilizándose el mismo extracto enzimático obtenido de la extracción de PPO, variando solamente el pH del solución amortiguadora de

reacción de 6.2 a 6.0. Se colocaron en celdas del espectrofotómetro de 3 ml, 1340 µl de solución amortiguadora (McIlvaine) pH 6.0, con 30 µl de ABTS (2'2-Azino-bis-3-ácido etilbenzotiazolona-6 sulfónico) 0.05 M, 80 µl de peróxido de hidrógeno 5 mM y 100 µl del extracto enzimático, el desarrollo del color fue medido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 414 nm y 25°C, durante 3 minutos. La actividad se expresó como Unidades de Actividad/gramo de peso fresco (UA/gpf), siendo una UA equivalente al cambio de 0.001 unidades de absorbancia por minuto, y el cambio de actividad por gramo de peso fresco se expresó como sigue:

$$\text{Actividad de POD (UA / gpf)} = \frac{\text{Lectura} * 1000}{0.025}$$

IV.3.1.3. Determinación de fenoles totales

Se utilizó el método desarrollado por Singleton y Rossi, (1965). Se pesaron 1.5 g de pulpa de durazno y se adicionaron 15 ml de etanol al 80%, se homogeneizó durante 1 minuto, se filtró con manta de cielo y se dejó reposar durante 30 minutos, el sobrenadante se utilizó para la determinación de fenoles.

◆ Preparación de reactivos:

Reactivo A: Solución de tartrato de sodio-potasio tetrahidratado 2.7% (p/v).

Reactivo B: Solución de carbonato de sodio al 2% (p/v) en hidróxido de sodio 0.1M. No debe almacenarse por más de 2 meses.

Reactivo C: Se preparó tomando una parte en volumen del reactivo A mas 99 partes del reactivo B. Este reactivo se debe preparar al momento del análisis.

Reactivo D: Se preparó tomando una parte del reactivo comercial Folin-Ciocalteu mas una parte de agua destilada, al igual que el reactivo anterior debe prepararse al momento del análisis.

◆ **Cuantificación:**

En un tubo de ensayo se colocaron 250 μ l del extracto de fenoles más 2500 μ l del reactivo C y después de 10 minutos se adicionaron 250 μ l del reactivo D, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se leyó la absorbancia a 750 nm.

La cuantificación de fenoles se realizó utilizando una curva estándar de 0 a 0.125 mg/ml de ácido cumárico (Ver Apéndice A).

IV.3.1.4. Separación e identificación de fenoles utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La cuantificación e identificación de algunos de los compuestos fenólicos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando la metodología desarrollada por Jaworski y Lee, (1987). A 5 g de tejido liofilizado se le adicionaron 200 g de etanol al 80%, se homogeneizó durante 5 minutos y se filtró a vacío utilizando papel Whatman #4, el extracto se concentró en un Rotavapor a 46°C hasta que se obtuvieron de 5 a 8 g, se aforó a 25 ml con Acetonitrilo (CH_3CN) al 20% y se centrifugó a 4000 rpm, durante 10 minutos.

El extracto de fenoles fue pasado por una columna de separación incluida en un cartucho (Sep-Pak C_{18}) marca Waters® el cual se preconditionó o activó haciendo pasar 5 ml de acetato de etilo, seguido de 5 ml de etanol al 95% y por último 5 ml de HCl 0.01 N, se secó con N_2 , y enseguida se le hizo pasar 7 ml del extracto de fenoles, se secó nuevamente con N_2 , y se le adicionó 5 ml de Acetonitrilo 100%, ésta se consideró la fracción a utilizar. Después de ésta operación, la muestra se mantuvo en congelación a -20°C . Previo a su análisis, se reconstituyó en 1 ml de CH_3CN al 50%.

La separación e identificación de compuestos fenólicos se realizó por Cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando un equipo de la marca Waters® con 2 bombas Waters 510 y Detector de Arreglo de Diodos Waters 996. Para la separación de los diferentes compuestos, se utilizó una columna Nova-Pak C18 fase Reversa a una temperatura de 25 °C. Las muestras fueron corridas con una fase móvil con sistema de gradiente binario que consistió en: a) Ácido fosfórico (H₃PO₄) 0.5% y b) una mezcla compuesta de acetonitrilo (CH₃CN) al 90%, 9.5% de H₂O y 0.5% de H₃PO₄. El programa de gradiente utilizado fue el siguiente:

| Tiempo (Min) | A % | B % | Curva utilizada |
|-----------------|--------|--------|--------------------|
| 0 | 100 | 0 | -- |
| 45 | 65 | 35 | 7 |
| 55 | 65 | 35 | 7 |
| 58 | 0 | 100 | 7 |
| 60 | 0 | 100 | 7 |
| 70 | 100 | 0 | 7 |

Para la identificación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de durazno, se emplearon distintos estándares externos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, catequina, quercitina, rutina, vainillina, epicatequina, y baicaleína) tomándose como criterio de identificación, el tiempo de retención así como el espectro de absorción característico de cada compuesto tanto de los estándares como de los picos mostrados por la muestra.

Para la cuantificación de los compuestos identificados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Gramos del componente } i = \left[\frac{A_i}{A} \right]_{\text{estándar}} * m$$

Donde :

A_i = Área del componente identificado

m = Masa del estándar

A = Área del estándar

IV.3.1.5. Determinación de flavonoides totales

Para la extracción de flavonoides totales se empleó la metodología propuesta por Zhishen y *col.*, (1999). En un vaso de precipitado de 600 ml se colocaron 200 g de acetona al 80% v/v y 5 g de pulpa de durazno, el contenido se transfirió a un vaso de licuadora y se homogeneizó durante 3 minutos, se regresó la mezcla al vaso original, puesto sobre hielo, y se homogeneizó por 2 minutos más, posteriormente se filtró al vacío a través de papel Whatman cualitativo #4. El filtrado fue transferido a un matraz de fondo redondo de 500 ml para ser concentrado en un rotavapor a 45°C bajo vacío.

El concentrado se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con agua destilada, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se consideró el extracto de flavonoides para los ensayos.

◆ Cuantificación de flavonoides:

En matraces volumétricos de 10 ml se colocaron 4 ml de agua destilada y 1 ml del extracto, posteriormente se adicionaron 0.3 ml de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%,

después de exactamente 5 minutos se añadieron 0.3 ml de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10%; 6 minutos más tarde se adicionaron 2 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1M. Se aforó con agua destilada y se mezcló, se leyó Absorbancia a 510 nm contra un blanco de referencia el cual fue preparado de la misma forma añadiéndose agua en lugar de la muestra. Ver detalles de curva de calibración en Apéndice B.

IV.3.1.6. Potencial de oscurecimiento

El potencial de oscurecimiento es un variable directamente asociada con el oscurecimiento enzimático y en esto radica la importancia de su medición, se define como el grado de oscurecimiento que presente un fruto, el cual estará en función del contenido de compuestos fenólicos y de la actividad de PPO, además de la severidad del daño.

Para evaluarlo se pesaron 2.66 g de pulpa de durazno que se homogeneizaron en 15 ml de solución amortiguadora de ácido cítrico-fosfato de sodio pH 4.0 en un homogeneizador ULTRA TURRAX T-25 durante 1 minuto. El homogeneizado se centrifugó a 10000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante y este se consideró como el extracto para determinar el potencial de oscurecimiento. Para ello se colocó en una celda del espectrofotómetro registrándose la lectura a 420 nm, al tiempo 0 (t_0) y después de incubar durante 1 hora (t_1) en un baño de agua a 30°C (Cheng y Crisosto, 1995). El potencial de oscurecimiento fue calculado mediante la siguiente expresión.

$$P_{Osc} = Abs_{t_1} - Abs_{t_0}$$

Abs_{t_1} = Absorbancia después de 1 hora

Abs_{t_0} = Absorbancia al tiempo 0

IV.3.2. Determinación de variables asociadas indirectamente con el oscurecimiento enzimático para efecto de daño mecánico y daño por frío

IV.3.2.1. Conductividad

Esta medición representa una variable indirecta que indica el grado de daño que presenta el tejido. De acuerdo a Murata, (1990), algunos de los métodos empleados para determinar la permeabilidad se llevan a cabo midiendo, la velocidad de pérdida de solutos entre los que se encuentran, iones, aminoácidos, azúcares y pigmentos de los tejidos y el medio o midiendo la velocidad de consumo de iones, H-aminoácidos y carbohidratos dentro de los tejidos en un medio de incubación.

Después de cada tratamiento de daño mecánico o tiempo de almacenamiento, se tomaron al azar 10 discos de tejido de 1 cm de diámetro y 5 mm de altura, se colocó un grupo en un frasco que contenía 100 ml de agua destilada. Se agitó ligeramente durante 1h a 20°C. Al final de este periodo, se midió la conductividad eléctrica del agua con un conductímetro manual Corning® previamente calibrado con una solución de Cloruro de potasio (KCl) 0.01 M. Después las muestras se congelaron a -20°C durante 3 días. Al final del periodo de congelación cada muestra se llevó a 20°C, se agitó durante 1 hora y se realizó otra medición de la conductividad. La medición de conductividad de las muestras descongeladas se consideró como conductividad total al 100% y la conductividad de las muestras sin congelar se relacionó con aquella y se expresa como % de conductividad total (Cantwell y col., 1992):

$$\% \text{ Conductividad} = \frac{\text{Muestra sin congelar}}{\text{Muestra congelada}} * 100$$

IV.3.2.2. Harinosidad

La harinosidad es un factor de considerable importancia económica ya que es un factor limitante en el almacenaje refrigerado de duraznos y es uno de los primeros síntomas de daño por frío en este fruto; por lo que se consideró una variable de gran utilidad para conocer el periodo máximo de almacenamiento de los frutos en condiciones de estrés.

Para su determinación se tomaron 15 g de pulpa que se molieron en una licuadora durante 1 minuto, posteriormente se homogeneizó durante un minuto adicional con un homogeneizador ULTRA TURRAX T-25 hasta obtener un puré sin grumos. De este homogenado, se tomaron 5 g que se colocaron en un tubo de centrifuga y fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se colectó y pesó y la harinosidad se calculó con la siguiente expresión (Luchsinger, 1996):

$$\text{Harinosidad} = \frac{\text{g sobrenadante}}{\text{g pulpa}}$$

Este procedimiento se realizó por triplicado.

IV.3.3. Efecto de agentes antioxidantes e inhibidores de la actividad de PPO y POD

Se probaron seis agentes reportados en la revisión de literatura, con posibilidad de inhibir la actividad de PPO: ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido benzoico, cisteína, cloruro de sodio y 4-hexilresorcinol. Por lo que se realizó primeramente un estudio in vitro en el cual los extractos enzimáticos de PPO y POD se pusieron en contacto con diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos a estudiar, para determinar aquella concentración a partir de la cual se inhiben ambas enzimas, así como el compuesto o compuestos que tuvieran un mayor

porcentaje de inhibición. Una vez hecho esto, se aplicaron soluciones de estos compuestos mediante distintas técnicas con la finalidad de introducirlos y difundirlos en el tejido, asimismo se evaluó un método hidrotérmico.

IV.3.3.1. Estudios “in vitro”

Los extractos enzimáticos fueron preparados de la forma descrita y se determinó la actividad de cada una de las enzimas oxidoreductasas (Actividad de PPO y POD). Los antioxidantes e inhibidores una vez preparados a diferentes concentraciones (1,2,3,4 y 5 mM) se disolvieron en la solución amortiguadora de la mezcla de reacción. En forma simultánea se corrieron controles que no contenían los compuestos. Las actividades se determinaron por triplicado y los resultados se reportaron como % de inhibición, utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{UA / \text{gpf muestra} - UA / \text{gpf control}}{UA / \text{gpf control}} * 100$$

UA = unidades de actividad

gpf = gramos de peso fresco

IV.3.3.2. Estudios “in vivo”

IV.3.3.2.1. Inmersión a presión atmosférica

A partir de los resultados obtenidos de los estudios in vitro, se eligió el ácido ascórbico como inhibidor para realizar los estudios in vivo; como experimento inicial se planteó un experimento práctico, el cual de tener éxito se pudiera llevar a

cabo fácilmente durante el manejo poscosecha de los duraznos, éste consistió en sumergir los frutos de durazno en agua a 1°C durante 30 minutos (temperatura a la cual se encuentra el agua de enfriamiento durante el lavado del durazno en el proceso de selección) en la que previamente fue disuelto el antioxidante a una concentración 10 mM, ésta concentración fue mayor que las probadas in vitro ya que se consideró que probablemente se vería disminuida por su difusión al tejido.

Se utilizaron 60 frutos, 30 frutos para tratamiento y 30 frutos control, es decir, sólo sumergidos en el agua de enfriamiento durante el mismo periodo de tiempo. Los duraznos se lavaron, se dejaron escurrir y se secaron con una franela, la mitad se sumergió en la solución con ácido ascórbico en donde permanecieron durante 30 minutos y nuevamente se dejaron escurrir, para posteriormente ser colocados en charolas de plástico a temperatura ambiente, en donde permanecieron durante 3 días, esto mismo se hizo para los duraznos control. Las determinaciones de actividad de PPO y POD se realizaron diariamente por triplicado, como se describe en IV.3.1.1. y IV.3.1.2.

IV.3.3.2.2. Infiltración a vacío

Una vez elegido el inhibidor y la concentración a utilizar se prepararon 54 frutos de la variedad 'Criollo' que se subdividieron en lotes de 18 frutos cada uno; a cada lote se le agregó la solución del inhibidor recién preparada y se colocaron en una estufa bajo vacío (15 pulgadas de presión); cada lote fue asignado para cada tiempo de tratamiento al vacío (5, 10 y 15 minutos), después de tratados, los frutos se dejaron escurrir y secar, para posteriormente ser colocados en charolas donde se mantuvieron a temperatura ambiente ($\cong 25^{\circ}\text{C}$). Los duraznos control (18 frutos) se sumergieron en agua durante 15 min. Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron diariamente durante 3 días, como se describe en IV.3.1.1. y IV.3.1.2.

IV.3.3.2.3. Tratamiento térmico

Un conjunto de 90 frutos fueron sometidos a tratamiento hidrotérmico a 50°C durante 3, 6, y 9 minutos; al final de cada tiempo se separaron 18 frutos que fueron inmediatamente enfriados en agua con hielo mantenida a 5°C durante 3 minutos, posteriormente se escurrieron, secaron y se dejaron a temperatura ambiente en charolas de plástico. Diariamente, durante tres días, se separaron 6 frutos de cada tiempo de tratamiento para ser analizada la actividad enzimática de PPO y POD en piel. Otro lote adicional de 18 frutos fue utilizado como control el cual solo se mantuvo en el agua de enfriamiento durante 3 minutos, se escurrió, se secó y se colocaron en charolas de plástico donde permanecieron los 3 días durante los cuales se realizaron los análisis de actividad de la forma indicada.

IV.4. Análisis estadístico

El método estadístico utilizado para la interpretación de la primera parte de los resultados (caracterización de variedades) fue de análisis por Componentes Principales, así como el Análisis de Cúmulos o agrupamientos.

Para evaluar el efecto de tratamiento (daño mecánico y almacenamiento refrigerado) en duraznos 'Criollo tardío' y 'Regio' se utilizó un Análisis de varianza. Para la realización de cada análisis se efectuaron tres submuestreos.

V. RESULTADOS

V.1. Análisis preliminares

V.1.1. Diferencia en medición de actividad de PPO en piel y pulpa

La Figura 5 muestra las actividades de PPO determinadas tanto en piel como en pulpa de la selección 'S.J.A. Soto' originaria del Estado de Michoacán y analizadas en dos distintos experimentos. Aunque con amplias variaciones entre las muestras y entre experimentos se puede observar que la actividad de esta enzima tiende a ser mayor en la piel respecto de la que presenta la pulpa interior. Estos resultados sirvieron de base para que en los análisis subsecuentes (tratamiento de daño mecánico y daño por frío) se tomara la piel como el tejido de importancia para el análisis, además de que se consideró también pertinente hacerlo de esta forma ya que el oscurecimiento provocado por el daño mecánico se manifiesta en la superficie del fruto.

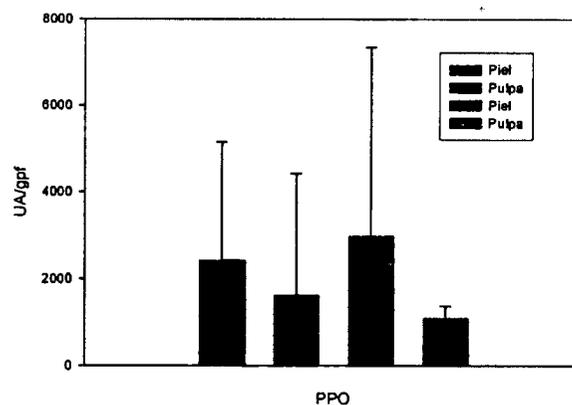


Figura 5. Actividad de polifenol oxidasa en piel y pulpa de duraznos 'S.J.A.Soto' de Michoacán.

V.2. Caracterización de los diferentes cultivares provenientes del Centro del País

V.2.1. Actividad de PPO, contenido de fenoles y flavonoides

En el Cuadro 5, se presentan los resultados de la actividad de polifenol oxidasa, el contenido de fenoles y de flavonoides totales para todas las selecciones y variedades estudiadas de las tres regiones consideradas. Se hace notar que este estudio consideró que la simple cuantificación de la actividad enzimática o del contenido de fenoles y flavonoides generaría un intervalo para cada uno de ellos que nos permitiría explicar la tendencia al oscurecimiento de cada una de esas variedades. Los intervalos de variación de actividad de PPO, fenoles y flavonoides fueron mayores para los frutos del Estado de Michoacán, seguidos por los de Querétaro y Aguascalientes (aunque las diferencias entre estos dos estados son menores respecto del primero). Esto podría hacer pensar que los frutos de Michoacán serían los únicos que presentarían oscurecimiento; sin embargo, también en las otras dos regiones se presentaron frutos con este problema sin haber llegado a los valores que mostraron aquellos.

Aunque no hubo una variable directa que nos indicara la tendencia de oscurecimiento en los distintos materiales, la observación durante el desarrollo de los experimentos indicó que los frutos provenientes del Estado de Michoacán presentaron una mayor susceptibilidad al oscurecimiento que se correlacionó con una mayor actividad enzimática pero esta relación no se presentó para el contenido de fenoles o flavonoides. En las otras dos regiones también se encontraron selecciones que presentaron susceptibilidad al oscurecimiento aunque con menor intensidad. En la región de Michoacán, las variedades que más se oscurecieron fueron 'S.J.A. Soto', 'S.J-H' y '16-10-122', mientras que 'Diamante Especial' fue la menos susceptible a oscurecer. Para el caso de Aguascalientes, las variedades con mayor oscurecimiento fueron 'Criollo tardío', '1023XD', 'CAG8', 'CP9115-C' y 'Pulpa blanca' en tanto que 'Amarillo de Junio' y 'CP-9564'

presentaron el menor grado de oscurecimiento. Para el caso de la región de Querétaro al igual que las dos anteriores presentaron cambios contrastantes, ya que mientras 'H14-6y-7', así como 'C-Carac' tuvieron mayor grado de oscurecimiento, 'DE-H', 'M1' y 'H 15-3' tuvieron poco oscurecimiento y esto se correlacionó con sus respectivas actividades de PPO.

Si se comparan los datos de las actividades enzimáticas y de los compuestos fenólicos así como de flavonoides, para aquellas selecciones que mostraron oscurecimiento, no existe un intervalo para cada uno de estos valores que permita clasificarlos y darnos información acerca del factor determinante del oscurecimiento. Por ejemplo, para el caso de PPO las variedades 'Criollo tardío', 'Criollo' y 'Pulpa blanca' de Aguascalientes si presentaron tendencia a oscurecerse pero su actividad enzimática fue baja (1017.5, 675.5 y 794.5 UA/gpf); en tanto que los duraznos de Michoacán con alta tendencia al oscurecimiento todos mostraron altas actividades, (por ejemplo 'S.J.A. Soto', '16-10-22' y 'S.J-H' tuvieron valores de 8 104.9, 4 772.8 y 5 767.2 UA/gpf respectivamente). Es decir, se presenta el mismo problema en frutos cuyas actividades de PPO son diferentes en un factor de 10; por ejemplo comparando 'S.J.A. Soto' con 'Pulpa blanca'.

La misma observación se puede hacer si se comparan dentro de una misma región las distintas variedades o selecciones, como en el caso de Aguascalientes la variedad 'Criollo tardío' que tuvo valores de actividad de 1 017.5 UA/gpf no se oscureció, en tanto que 'CP-9115C' con 4 626.7 UA/gpf si mostró oscurecimiento y 'Pulpa blanca' con 794.5 UA/gpf presentó fuerte oscurecimiento. Claramente se observa que no hubo valores de referencia que nos pudieran indicar susceptibilidad al oscurecimiento. Si se analizan los otros dos factores también podría llegarse a la misma conclusión y en el caso de 'Pulpa blanca' no se observa si la actividad o el contenido de fenoles o flavonoides explican la tendencia a oscurecer.

Cuadro 5. Resultados de actividad enzimática, contenido de fenoles, flavonoides y oscurecimiento subjetivo observado en diferentes variedades de durazno de distintas regiones del país.

| Variedad | AE PPO** (UA/gpf) | Fenoles totales (µg ác. cúmarico/gpf) | Flavonoides (µg cat/gpf) | Osc. observado |
|------------------------|----------------------|---|-----------------------------|-------------------|
| MICHOACAN | | | | |
| H9RS | 3359.6 | 860.1 | 109.2 | Alto |
| 16-10-122 | 4772.8 | 994.4 | 219.9 | Alto |
| ACUITZIO | 4066.3 | 741.4 | 432.9 | Alto |
| S.J.A.SOTO | 8104.9 | 1289.2 | 386.3 | Muy alto |
| D.ESP | 2675.2 | 446.7 | 127.2 | Bajo |
| S.J-H | 5767.2 | 579.9 | 333.1 | Alto |
| 88-2-1 | 643.6 | 1906.6 | 754.9 | Moderado |
| REGIO* | 1188.8 | 2315.6 | 2036.9 | Moderado |
| DIAMANTE | 811.6 | 2072.4 | 2116.1 | Bajo-mod |
| D.ESP- 2 | 647.8 | 1709.4 | 1855.4 | Bajo |
| AGUASCALIENTES | | | | |
| 91-19 DIAM | 2476.9 | 1302.2 | 427.8 | Alto |
| CAG8 | 2788.4 | 1040.0 | 589.3 | Alto |
| 92-POZO-12 | 2611.0 | 1608.4 | 648.7 | Alto |
| CP-9564-C | 1157.7 | 1097.4 | 178.0 | Bajo-mod |
| CP-9115-C | 4626.7 | 1318.4 | 336.4 | Alto |
| CP-9116-C | 2121.9 | 1378.3 | 457.2 | Alto |
| 1023XD | 3033.5 | 1004.9 | 159.8 | Alto |
| CP-8631-C | 1872.8 | 582.7 | 289.9 | Mod-alto |
| 7NG8 | 2000.6 | 1806.3 | 268.8 | Alto |
| A.JUNIO | 897.3 | 990.6 | 274.2 | Bajo-mod |
| CP-8810-C | 1304.4 | 1262.5 | 381.7 | Moderado |
| CRIOLLO | 665.5 | 1076.9 | 548.4 | Mod-alto |
| CRIOLLO TARDIO* | 1017.5 | 1055.4 | 361.4 | Alto |
| MG | 1553.9 | 1378.9 | 280.4 | Alto |
| SAN GABRIEL | 1132.8 | 1364.5 | 439.0 | Alto |
| SAN CARLOS. | 1414.3 | 823.4 | 536.6 | Moderado |
| ANA | 722.3 | 1305.8 | 478.5 | Moderado |
| PULPA BLANCA | 794.5 | 774.2 | 268.2 | Alto |
| QUERÉTARO | | | | |
| L.SCAN | 1170.1 | 772.9 | 231.2 | Moderado |
| H 27-14 | 996.8 | 1116.4 | 233.5 | Mod-alto |
| H-14 9Y10 | 1697.7 | 745.9 | 99.8 | Moderado |
| H-14 6Y7 | 2079.6 | 889.9 | 137.9 | Alto |
| H 23-22 | 1407.0 | 1080.1 | 196.2 | Mod-alto |
| DE-H | 721.1 | 1022.7 | 213.0 | Moderado |
| H-19 12Y18 | 2104.8 | 1115.5 | 260.9 | Mod-alto |
| HI-ACUIT-S | 617.3 | 1775.4 | 526.7 | Alto |
| C-CARAC | 2021.3 | 801.9 | 168.7 | Alto |
| RINJ-H | 1387.4 | 726.5 | 176.0 | Moderado |
| H20-1AXNE | 1579.6 | 1227.8 | 155.3 | Alto |
| H-8 19Y20 | 857.5 | 1384.9 | 241.1 | Alto |
| OAZ | 1042.1 | 733.2 | 138.7 | Moderado |
| H 15-3 | 776.2 | 1103.5 | 201.6 | Moderado |

| Variedad | AE PPO** (UA/gpf) | Fenoles totales (μg ác. cumárico/gpf) | Flavonoides (μg cat/gpf) | Osc. observado |
|----------|----------------------|---|---|-------------------|
| M1 | 984.8 | 1056.6 | 324.0 | Bajo-mod |
| M2 | 1209.0 | 905.1 | 397.2 | Alto |
| M3 | 1319.8 | 962.3 | 518.8 | Alto |
| Z | 1103.2 | 2119.7 | 1948.0 | Mod-alto |

Cuadro 5. Continuación

**AE PPO = Actividad enzimática de PPO

gpf = gramos de peso fresco

Con el objeto de agrupar los distintos materiales de manera que puedan representar una información útil para los trabajos de mejoramiento genético, se realizó un análisis de componentes principales y agrupamiento en el cual se incluyeron las variables numéricas medidas anteriormente.

a) Análisis de Componentes Principales

El término componente principal hace referencia a la combinación lineal de las variables analizadas. De nuestros datos se pueden obtener 3 componentes principales dado que se tienen tres variables (PPO, Fenoles y Flavonoides); el Cuadro 6 concentra los valores de este análisis en el que se observa que el componente principal 1 (C1) constituyó el 61% de la varianza de los cultivares analizados, por lo que se consideró el más importante; mientras que el componente principal 2 (C2) representó el 30% de la varianza total y por lo tanto el segundo en importancia, el componente principal 3 sólo representó el 9% de la varianza y quedó excluido en la interpretación de los resultados.

Cuadro 6. Valores concentrados obtenidos para el análisis de componentes principales.

| | C1 | C2 | C3 |
|--------------------------|--------|-------|--------|
| Desv. Est | 1.360 | 0.945 | 0.508 |
| Varianza | 0.616 | 0.297 | 0.086 |
| Prop. Acumulativa | 0.617 | 0.914 | 1.000 |
| Carga | | | |
| Polifenol oxidasa | -0.335 | 0.942 | ---- |
| Fenoles | 0.667 | 0.231 | -0.708 |
| Flavonoides | 0.665 | 0.243 | 0.706 |

En este mismo Cuadro se expresa el peso de cada una de las variables analizadas con los cuales se dan las expresiones simbólicas de cada uno de los componentes.

Componente principal 1:

$$C_1 = -0.335 \text{ PPO} + 0.667 \text{ Fenoles} + 0.665 \text{ Flavonoides}$$

Componente principal 2:

$$C_2 = 0.942 \text{ PPO} + 0.231 \text{ Fenoles} + 0.243 \text{ Flavonoides}$$

C1 evidencia que las mayores diferencias entre variedades se debe a un contraste entre PPO y (Fenoles y Flavonoides), C2 indica que una segunda parte de variabilidad se debe al aumento de actividad de PPO. Así, en estas expresiones y para el caso de C1 nos indica que altas actividades de PPO están localizadas a la izquierda mientras que altos contenidos de fenoles y flavonoides estarían ubicados a la derecha de un diagrama de componentes principales (Figura 6). Para el caso del componente C2, los que tienen una alta actividad de PPO están ubicados arriba mientras que los que tienen bajo contenido de fenoles y flavonoides están ubicados abajo.

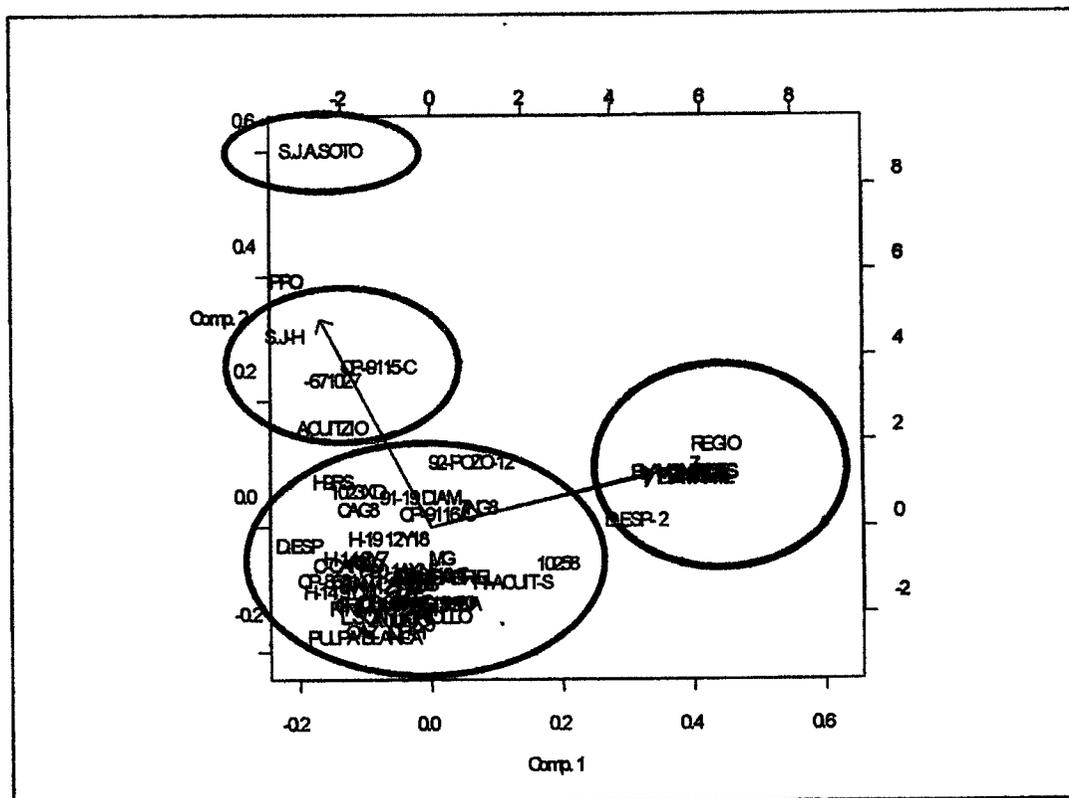


Figura 6. Agrupamiento de las diferentes selecciones de acuerdo al análisis de componentes principales.

En la misma Figura 6, se presenta la agrupación de los distintos cultivares de acuerdo a sus componentes. Es posible identificar 4 grupos principales, estando conformados de la siguiente forma: 1) 'S.J. A.Soto' con muy alta actividad de PPO; 2) 'CP-9115-C', 'S.J-H', '671027' y 'Acuitzio' con alta actividad de PPO y bajo contenido de fenoles y flavonoides; 3) 'Regio', 'Z', 'Diamante', y 'D-Esp-2' constituyen un tercer grupo con alto contenido de fenoles y flavonoides y baja actividad de PPO, mientras que el grupo 4 está constituido por el resto de la variedades con un contenido de bajo o medio de fenoles y flavonoides así como de actividad de PPO.

b) Análisis de Agrupamiento (Cluster Analysis)

Este tipo de análisis, dado como un dendrograma, complementa la información del análisis de componentes principales, porque permite agrupar las diferentes variedades en función de distancias euclidianas elegidas de acuerdo al grado de diferencia que el experimentador desea identificar. Al observar la figura 7, a una distancia (height) cero, todas las variedades serían diferentes; mientras que si se aumentan la distancias (en el eje vertical) se localizan ramificaciones que identifican distintos grupos de variedades que el experimentador analiza si son o no importantes desde el punto de vista del factor que le interesa. En el extremo superior se encuentra el origen de todas la ramificaciones el cual indica que a esa distancia todas la variedades son iguales.

En el Cuadro 7 se presenta de manera detallada los diferentes grupos de variedades que se formaron a tres distintas distancias elegidas; así como también las variedades que los conforman y sus características de composición para las variables elegidas. Desde el punto de vista de mejoramiento genético podría ser importante decir que para una distancia de 3.5 el grupo 4 formado por las variedades 'Regio' y 'Diamante especial' podrían conformar una base de materiales con menor tendencia al oscurecimiento; mientras que los grupos 1 y 2 serían los menos apropiados para generar esas variedades. No obstante, debe anotarse que dentro del grupo 3 también se presentaron variedades que mostraban tendencia a oscurecer aun cuando sus valores de actividad de PPO o su contenido de fenoles y flavonoides fueran bajos.

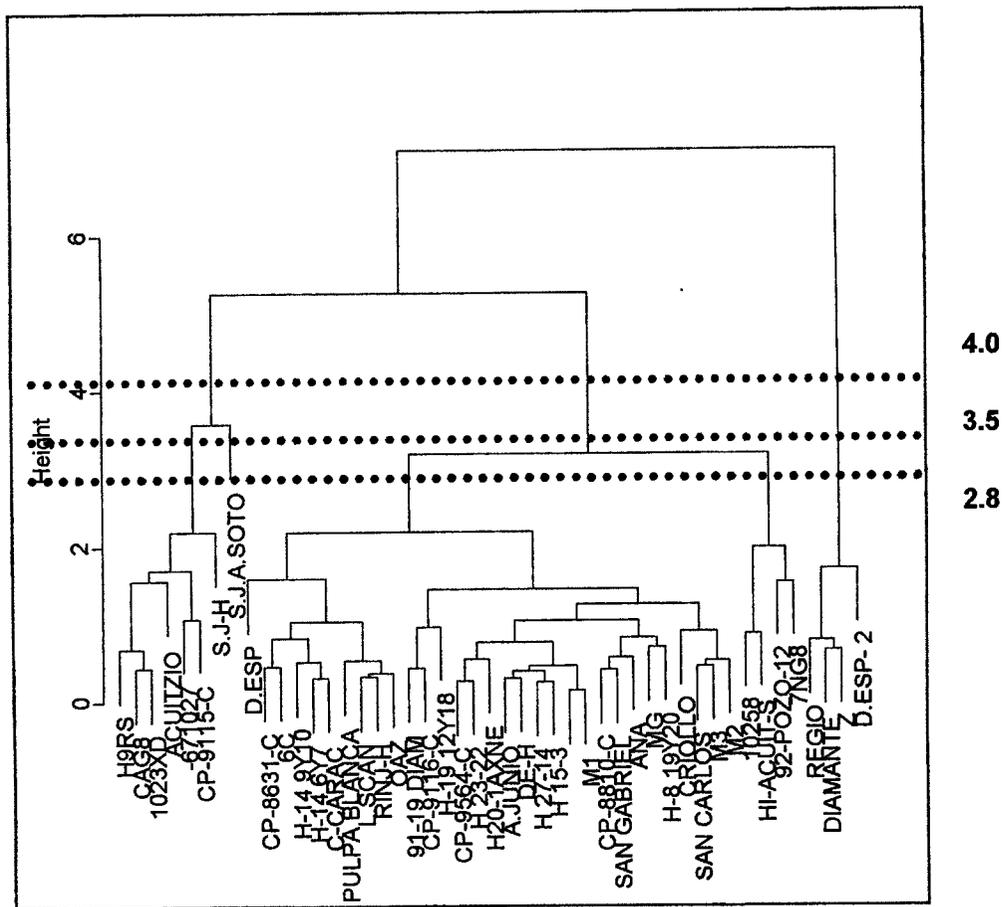


Figura 7. Agrupación de los distintos cultivares de durazno de acuerdo al análisis estadístico de agrupamiento.

Cuadro 7. Grupos obtenidos mediante el análisis de agrupamiento o cúmulos.

| Distancia euclídana | No. de grupos | Cultivares que lo constituyen | Características |
|---------------------|---------------|--|--|
| 2.8 | 5 | 1. H9RS - SJ-H 2. S.J.A.SOTO 3. D.ESP-M2 4.1023XD-7NG8 5.REGIO-D.ESP | Alta PPO y promedio de fen-flavs Muy alta actividad de PPO PPO y fen y flavs promedio PPO baja y fen y flavs promedio PPO baja y fen y flavs altos |
| 3.5 | 4 | 1. H9RS-SJ-H 2. S.J.A.SOTO 3. D.ESP - 7NG8 4. REGIO-D.ESP | Alta PPO y promedio de fen-flavs Muy alta actividad de PPO PPO y fen y flavs promedio PPO baja y fen y flavs altos |
| 4 | 3 | 1.H9RS-S.J.A.SOTO 2. D.ESP-7NG8 3.REGIO-D.ESP | Alta PPO y promedio de fen-flavs PPO y fen y flavs promedio PPO baja y fen y flavs altos |

fen-flavs = fenoles y flavonoides

V.3. Efecto de daño mecánico

En forma simultánea a la caracterización de los materiales genéticos, se separaron dos materiales (uno de la zona de Michoacán y otro de la zona de Aguascalientes). La elección de los materiales se llevó a cabo a partir de los resultados ya presentados y considerando que los frutos de Michoacán tienen una mayor tendencia al oscurecimiento en tanto que en los de Aguascalientes esta tendencia es menor. Con estos materiales, contrastantes entre sí, se estudió el efecto que podría tener el daño mecánico en el desarrollo del oscurecimiento y éste explicarlo en función de las actividades de las enzimas involucradas (PPO y POD) así como de su contenido de fenoles y flavonoides.

❖ Análisis de varianza de las variables asociadas al oscurecimiento enzimático ocasionado por daño mecánico

En el Cuadro 8, se concentran los resultados del nivel de significancia de cada una de las variables sometidas al análisis de varianza para los factores tratamiento (control y dañados), variedad ('Criollo tardío' y 'Regio') y tiempo de almacenamiento (1 a 4 días). En forma general, se observa que el tiempo de almacenamiento solo fue significativo para el potencial de oscurecimiento; las actividades enzimáticas no fueron afectadas por ninguno de los tres factores; mientras que el contenido de fenoles totales sí presentó diferencias respecto del tratamiento, la variedad y el tiempo de almacenamiento; por su parte el contenido de flavonoides sólo mostró diferencias con el factor variedad; la conductividad tuvo significancia con respecto al tiempo de almacenamiento y la harinosidad o jugosidad tuvo efectos significativos de tratamiento y variedad.

Dada la complejidad del problema de oscurecimiento que muestran los frutos de durazno respecto del fenómeno de oscurecimiento, consideramos importante

señalar algunos aspectos adicionales a este análisis, en cada una de las variables, que podrían tener algún peso en futuros trabajos a este respecto.

Cuadro 8. Niveles de significancia de las distintas variables involucradas en el desarrollo de oscurecimiento de frutos de durazno sometidos a daño mecánico.

| Variables | Tratamiento | Variiedad | Tiempo (hrs) |
|---------------|-------------|-----------|--------------|
| P.OBS | 0.7278 | 0.4095 | 0.0180* |
| PPO | 0.3064 | 0.1879 | 0.6193 |
| POD | 0.4720 | 0.4817 | 0.6498 |
| FENOLES | 0.0032* | 0.0001* | 0.0348* |
| FLAVONOIDES | 0.2260 | 0.0032* | 0.4238 |
| CONDUCTIVIDAD | 0.8083 | 0.9021 | 0.002* |
| HARINOSIDAD | 0.0277* | 0.0010* | 0.8126 |

* Variables estadísticamente significativas

V.3.1. Principales variables asociadas con el oscurecimiento

V.3.1.1. Potencial de oscurecimiento

La Figura 8, presenta el potencial de oscurecimiento de las dos variedades contrastantes analizadas. Aún cuando el análisis estadístico no tuvo diferencias respecto de las variedades, lo cual puede ser explicado por el dato que presenta 'Criollo tardío' a las 72 horas y el que no se ajusta al comportamiento esperado. Por ello es importante hacer una descripción de esta variable; observando los comportamientos mostrados por los frutos control de ambas variedades, se aprecia que alcanzan un potencial de oscurecimiento similar (valores de absorbancia de 0.25) en diferentes tiempos, la variedad 'Criollo tardío' lo alcanzó a las 48 horas mientras que 'Regio' lo alcanzó a las 72 horas, sin embargo no se tiene explicación para la disminución presentada por 'Criollo tardío' a las 72 horas. En los frutos dañados por impacto, también contrario a lo esperado la variedad

'Criollo tardío' mostró un mayor potencial de oscurecimiento con respecto a la variedad 'Regio' alcanzando valores de absorbancia de 0.35 mientras que los frutos de 'Regio' tuvieron diferencias de absorbancia similares al día 0. Este resultado es contrario a lo esperado pues suponemos que los materiales de Michoacán deberían haber presentado un mayor potencial de oscurecimiento ya que en la caracterización de los materiales; 'Regio' presentó una actividad ligeramente mayor de PPO y mayor contenido de fenoles y flavonoides que fueron casi el doble respecto de 'Criollo tardío'. Aunque en la caracterización subjetiva del oscurecimiento, 'Criollo tardío' mostró una alta tendencia al oscurecimiento y para 'Regio' fue moderada lo cual concuerda con los datos de potencial de oscurecimiento aquí mostrados.

El factor tiempo de tratamiento manifestó diferencias, observándose que el potencial de oscurecimiento fue mayor conforme transcurrió el almacenamiento tanto en frutos dañados como no dañados y siendo mayor en 'Criollo tardío'. Este comportamiento no tuvo una correlación lógica con los parámetros del oscurecimiento.

El cambio del potencial de oscurecimiento con el tiempo de almacenamiento no ha sido reportado anteriormente y es otro aspecto que se debe de tomar en cuenta en posteriores estudios.

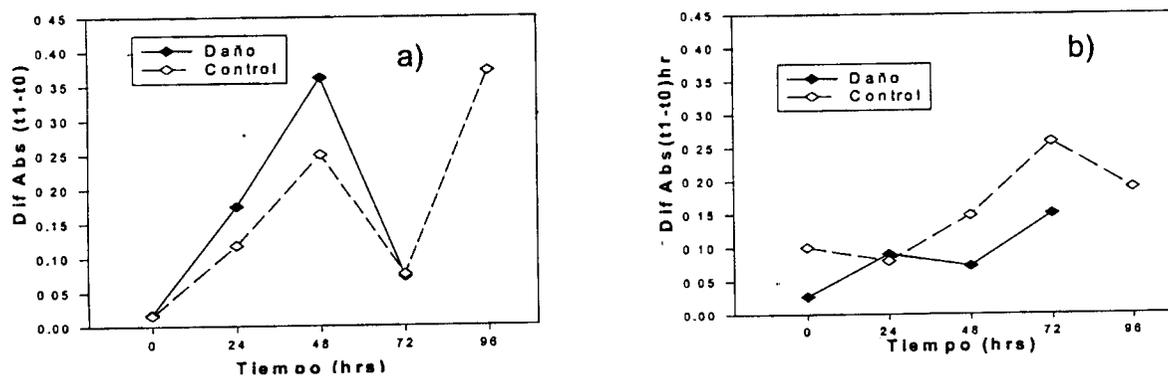


Figura 8. Potencial de oscurecimiento en frutos control y sometidos a impactos con una masa de acero de 60 g desde 30 cm de altura, a) variedad 'Criollo tardío' y b) 'Regio'.

V.3.1.2. Actividad Enzimática (PPO y POD)

La Figura 9, presenta los cambios observados en las actividades de PPO y POD de los frutos de las dos variedades contrastantes en su tendencia al oscurecimiento y sometidos a impactos con balín de acero así como de los frutos control. La actividad de PPO fue muy similar entre variedades coincidiendo con lo encontrado en la caracterización de materiales señalado en la primera parte de estos resultados. Sin embargo, llama la atención que tampoco hubiera diferencias entre frutos control y dañados. No obstante, después de un día de almacenamiento, los frutos dañados manifestaron oscurecimiento en las áreas impactadas en ambas variedades (Figura 10). Comparando los niveles de actividad de las dos enzimas se observa que POD mostró los valores más altos con tendencia a incrementarse después de tres días de almacenamiento para la variedad 'Criollo tardío' mientras que para 'Regio' empieza con valores más altos para después disminuir hasta el final del almacenamiento.

En cada una de las variedades, no se apreció una clara tendencia que indique que los frutos dañados tuvieran mayor actividad con respecto a los frutos control; y tampoco se observa que los frutos susceptibles al oscurecimiento ('Criollo tardío') tuvieran mayor actividad respecto de los tolerantes ('Regio'). Dado que el oscurecimiento se presentó después de 24 horas de haber sido impactados los frutos, esto sugiere que para que el oscurecimiento ocurra no se requiere de incrementos en la actividad de ambas enzimas. Aunque es probable que el incremento manifestado después de 72 horas en la actividad de POD en 'Criollo tardío' explique el incremento en el potencial de oscurecimiento señalado en el apartado anterior.

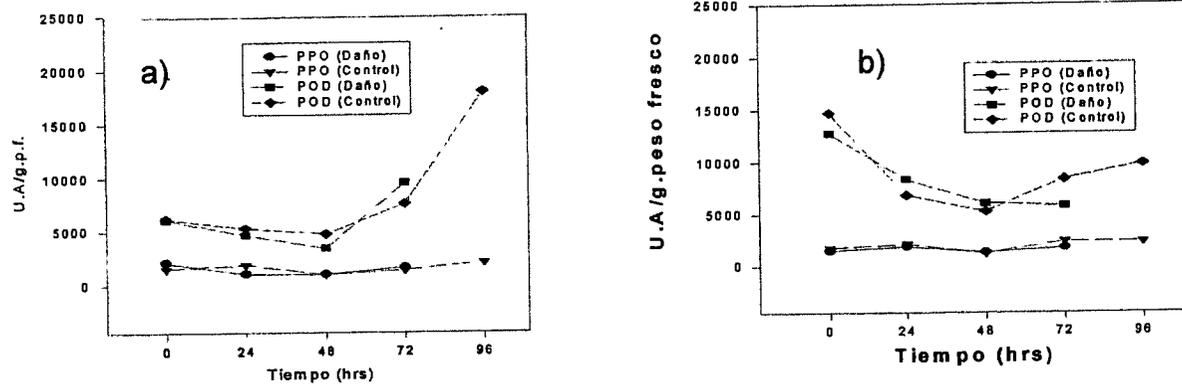


Figura 9. Cambios en la actividad enzimática de PPO y POD en frutos control y dañados mecánicamente: a) 'Criollo tardio' y b) 'Regio'.

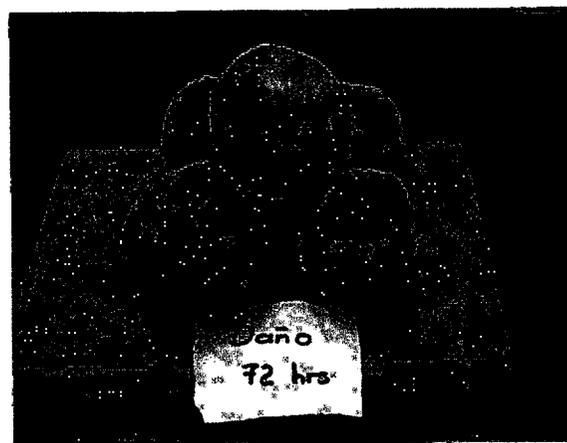


Figura 10. Efecto de golpe con balón sobre la pulpa de duraznos de la variedad 'Regio' en el tercer día de almacenamiento (72 hrs).

V.3.1.3. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales en las dos variedades estudiadas sometidas al impacto mecánico se muestra en la Figura 11. Nuevamente resalta el hecho que el cultivar 'Regio' tuvo un mayor contenido de estos compuestos respecto del 'Criollo tardío' ya que los frutos control de ambos cultivares presentaron valores de 2 y 1.1 mg de ác. cumárico/gpf, respectivamente. Los frutos que fueron sometidos a los impactos con el balín metálico, presentaron un mayor contenido de fenoles siendo este incremento mucho más evidente en 'Regio' que en 'Criollo tardío' alcanzando valores de 2.5 y 1.5 mg de ác. cumárico/gpf respectivamente. Aunque este incremento fue percibido desde el primer día para el 'Regio' en el 'Criollo tardío' se presentó después de las 48 horas de haberse aplicado los impactos a los frutos. Los resultados del contenido de fenoles totales vuelven a llamar la atención respecto del proceso de oscurecimiento que aquí se pretendió estudiar ya que el 'Criollo tardío' tuvo un potencial de oscurecimiento mayor y sin embargo, su contenido de fenoles fue menor y lo contrario se puede indicar para el caso de 'Regio' esto indicó poca relación del oscurecimiento con el contenido de fenoles, este mismo comportamiento se tuvo para la actividad de PPO.

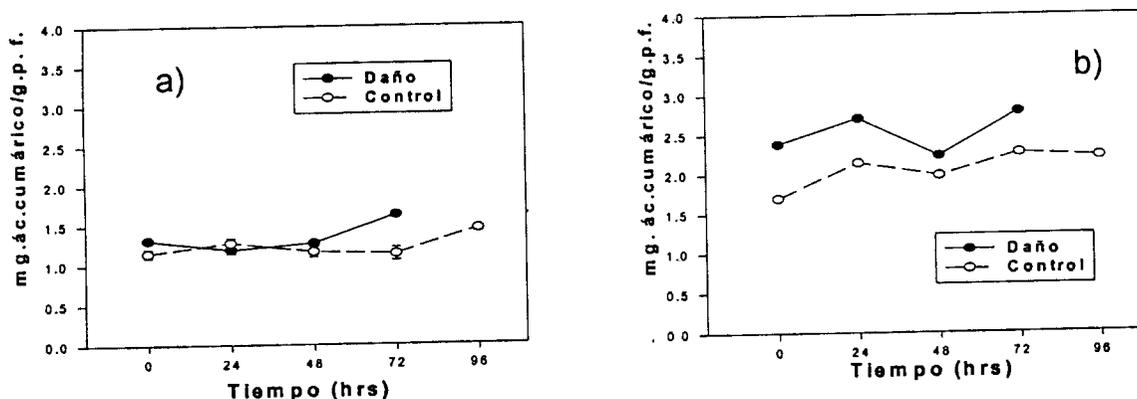


Figura 11. Cuantificación de fenoles totales expresados como mg de ácido cumárico/g.p.f., en frutos control y dañados mecánicamente, a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio'.

V.3.1.4. Caracterización parcial de fenoles por HPLC

Bajo el mismo criterio de comparación de las dos variedades ya mencionadas se inyectaron los extractos de los compuestos fenólicos tanto de frutos control como de frutos dañados por impacto. Las Figuras 12 y 13, muestran los cromatogramas obtenidos para esas muestras a las 72 horas de almacenamiento de los frutos a 5°C y 5+20°C. Los compuestos fenólicos identificados en las dos variedades fueron el ácido clorogénico y la catequina con tiempos de retención de 32.24 y 30.01 para el sistema de gradiente utilizado y los cuales tuvieron un espectro de absorción similar a los compuestos utilizados como patrón. El ácido clorogénico fue el que se encontró en mayor proporción mientras que la catequina se encontró en menor concentración en cada una de las variedades.

Nuevamente de forma contrastante y de acuerdo con lo encontrado en la cuantificación de los fenoles totales, la variedad 'Criollo tardío' manifestó menores señales de absorbancia que la variedad 'Regio' y no obstante aquella variedad tuvo un potencial de oscurecimiento mayor. Con las concentraciones de ácido clorogénico y de catequina para cada uno de los días analizados después de la aplicación de los impactos se construyó la Figura 14, la cual presenta los cambios de estos compuestos después del almacenamiento. En los frutos control, el contenido de catequina para ambas variedades fue muy similar entre ellos (0.2 µg/g.p.f); el ácido clorogénico para la variedad 'Criollo tardío' fue muy similar al contenido de catequina. Mientras que en la variedad 'Regio' el incremento se observó hasta las 48 horas de almacenamiento a 20°C (0.7 µg/g.p.f) para después disminuir las siguientes 24 horas. En los frutos dañados por impacto; no se apreció un efecto importante de este factor en 'Criollo tardío'; no así para 'Regio' que mostró un significativo incremento de este compuesto en los frutos dañados pero de forma no explicada cae hasta valores iniciales después de 72 horas. Los resultados aquí indicados, nuevamente llaman la atención ya que se esperaría que 'Regio' debiera tener una tendencia al oscurecimiento más pronunciada, pero esto no ocurrió por lo que la explicación al oscurecimiento de estos materiales espera

una explicación más adecuada respecto del mecanismo del como ocurren estas reacciones dentro del tejido.

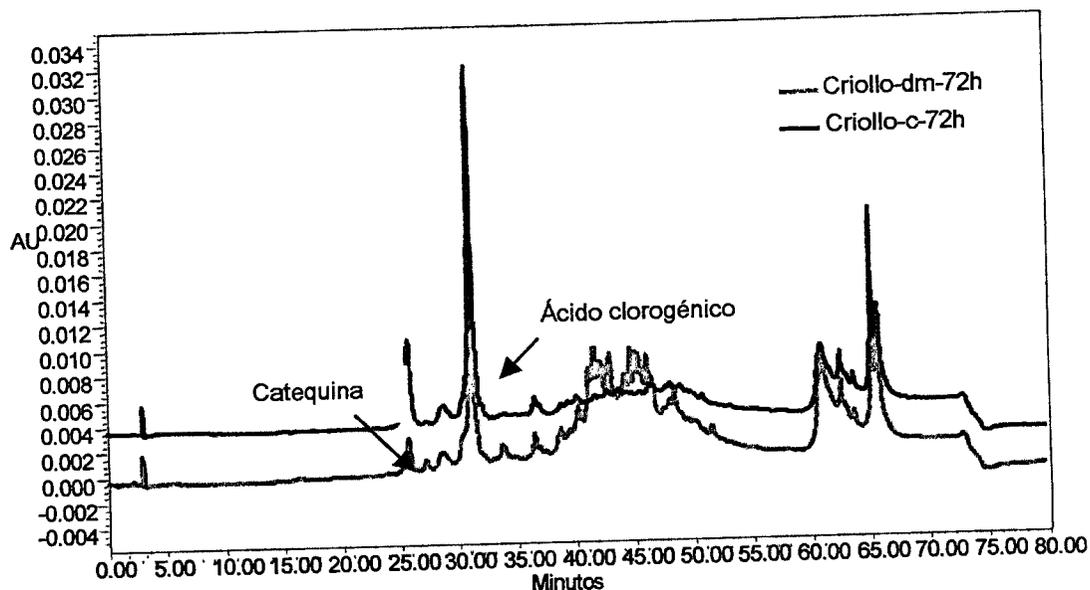


Figura 12. Cromatograma de extractos fenólicos de frutos del cultivar 'Criollo tardío' con daño mecánico y control después de 72 h.

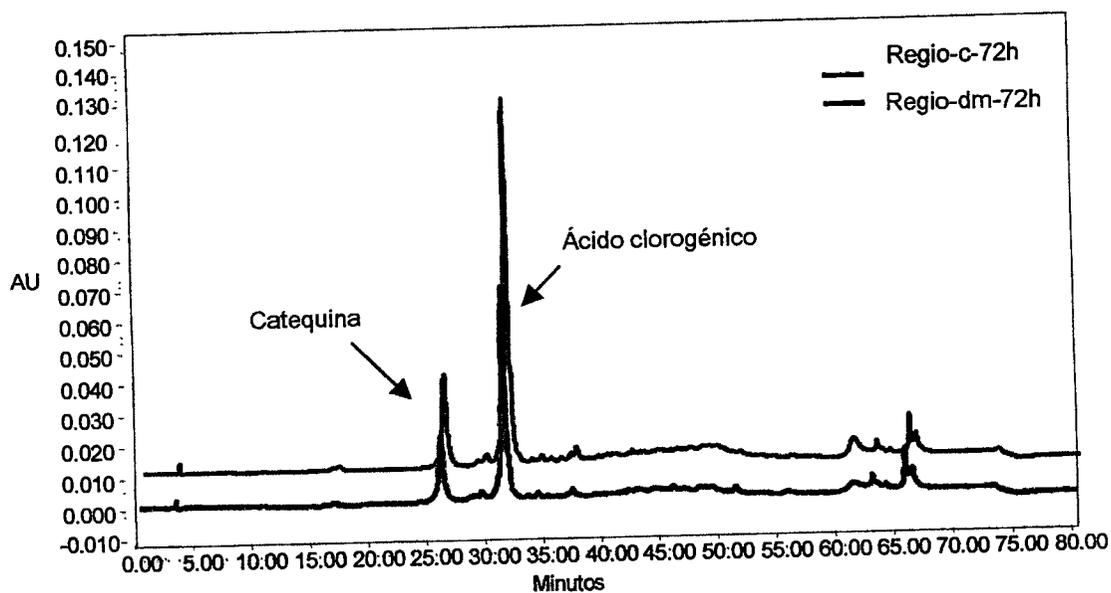


Figura 13. Cromatograma de extractos fenólicos para frutos del cultivar 'Regio' con daño mecánico y control después de 72 h.

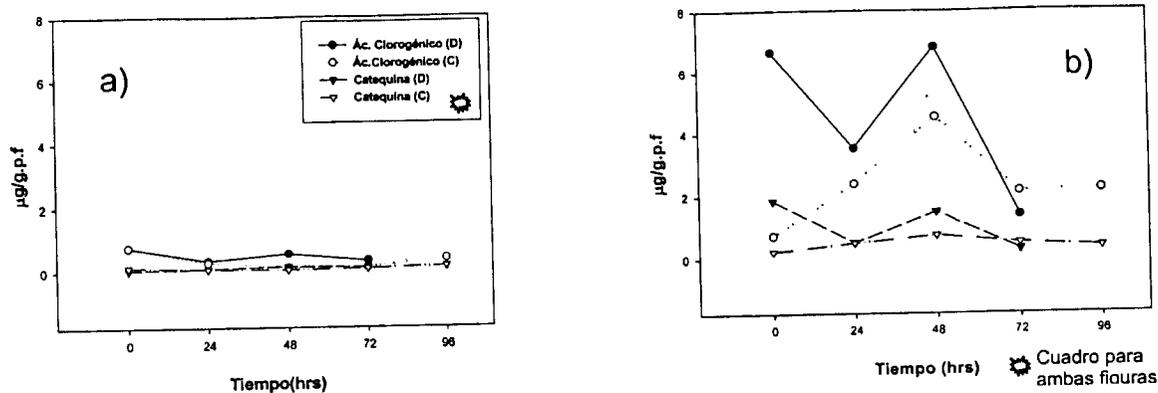


Figura 14. Contenido de ácido clorogénico y catequina en frutos de durazno de dos variedades contrastantes después de haber sido impactados con una masa de 60 g desde una altura de 30 cm, a) 'Criollo Tardío' y b) 'Regio'.

VI.3.1.5. Contenido de flavonoides

La Figura 15, muestra el contenido de flavonoides totales expresado como mg de catequina en las dos variedades estudiadas. Nuevamente la variedad 'Criollo tardío' presentó un menor contenido de estos compuestos respecto de la variedad 'Regio' y comparando el efecto de los impactos mecánicos sobre los frutos se puede apreciar que en 'Criollo tardío', los frutos con daño tuvieron una tendencia a disminuir después de 24 horas de almacenamiento hasta las 72 horas (0.3 mg catequina/gpf) mientras los frutos control tuvieron una ligera tendencia a incrementarse (1.0 mg catequina/gpf) pero sin ser tan diferentes de los valores iniciales (0.8 mg catequina/gpf).

Para el caso de la variedad 'Regio', los frutos control mostraron mayor contenido de flavonoides que los frutos impactados con una tendencia a incrementar hacia el final del periodo de almacenamiento a 20°C (5 mg catequina/gpf). Mientras que los frutos dañados casi no presentaron cambio durante el periodo de almacenamiento manteniéndose con 1.5 mg catequina/gpf.

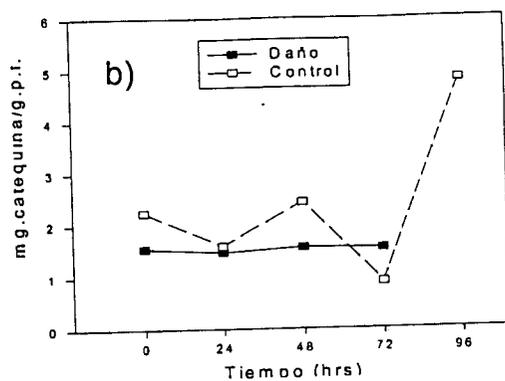
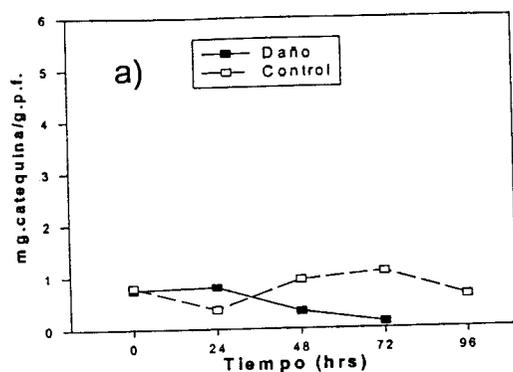


Figura 15. Cambios en el contenido de flavonoides en frutos dañados y control, almacenados a 20°C de dos variedades: a) 'Criollo Tardio' y b) 'Regio'.

V.3.2. Variables asociadas indirectamente con el oscurecimiento

V.3.2.1. Conductividad

Con la técnica utilizada no fue posible encontrar diferencias de permeabilidad entre los frutos control y dañados así como dentro de las variedades ya que los resultados fueron muy similares (Figura 16). Siendo lo que más llama la atención de las figuras anteriores el incremento de permeabilidad que muestran los frutos a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. Este incremento en la conductividad puede ser explicada como un proceso normal del fruto mientras transcurre su maduración o senescencia. Algunos autores han señalado que conforme los frutos pasan por el último estado de su desarrollo (senescencia) la funcionalidad de las membranas se pierde lo cual daría como resultado un incremento en la permeabilidad de las mismas que llevaría a mayores valores de conductividad (Kays, 1990).

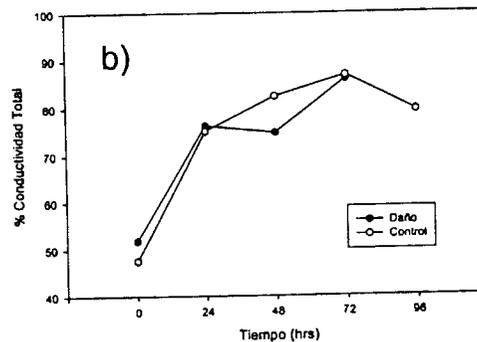
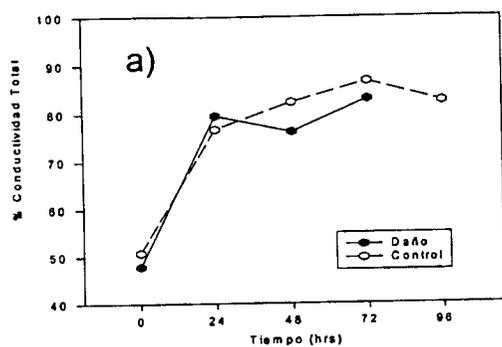


Figura 16. Porcentaje de conductividad en duraznos de la variedad a) 'Criollo Tardio' y b) 'Regio', en frutos control y dañados mecánicamente almacenados durante cuatro días (96h) a 20°C.

V.3.2.2. Harinosidad o pérdida de jugosidad

Dado que este factor, se asocia al efecto que puede tener el almacenamiento a bajas temperaturas y que puede alterar el comportamiento de las enzimas asociadas al metabolismo de pared celular como la poligalacturonasa entre otras; cuando es medido a condiciones de temperatura ambiente, puede servir como un parámetro de comparación entre variedades que nos indicaría el grado de jugosidad entre ellas y como ésta se podría ver afectada por otro tipo de daño.

En la Figura 17 se observa el efecto del daño mecánico sobre el la pérdida de jugosidad, que se manifestó de manera muy variable en las dos variedades estudiadas, ya que mientras los frutos dañados de la variedad 'Criollo tardío' tuvieron una pérdida drástica de jugosidad conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento (de 0.38 g.sobrenadante/gpf al inicio de tratamiento hasta 0.20 g sobrenadante/gpf al finalizar el mismo). Los frutos control de esta misma variedad mantuvieron un comportamiento constante. La variedad 'Regio', por el contrario, incrementó su jugosidad siendo mayor en los frutos golpeados que en los frutos control e incluso se incrementó durante el almacenamiento a 20°C hasta llegar a 0.45 g sobrenadante/gpf el tercer día. Al igual que los frutos dañados el control mostró una tendencia al incremento llegando a un valor de 0.4 g sobrenadante/gpf el último día de almacenamiento.

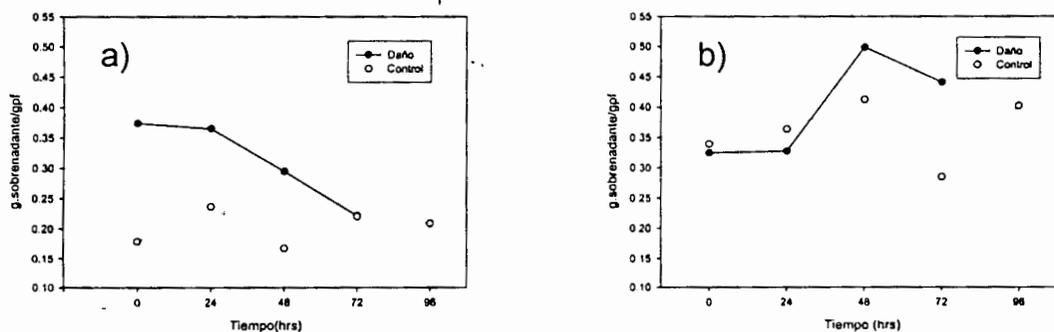


Figura 17. Falta de jugosidad manifestada por los frutos de la variedad: a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio' después de haber sido golpeados con un balón de 60 g y almacenados durante cuatro días (96 h) a 20°C.

V.4. Efecto del almacenamiento refrigerado

❖ **Análisis de varianza de las variables asociadas al oscurecimiento durante el almacenamiento refrigerado**

El Cuadro 9 presenta los niveles de significancia de cada una de las variables analizadas para los frutos almacenados durante cuatro semanas a 5°C, así como sus respectivas transferencias a 20°C; siendo el factor tratamiento el almacenamiento a 5 y (5+20)°C; el factor variedad, fueron 'Criollo tardío' y 'Regio', y el factor tiempo, el periodo de almacenamiento. De acuerdo a estos resultados, el almacenamiento a 5°C y (5+20)°C produjeron efectos diferentes sobre la actividad de PPO así como en la manifestación de la harinosidad siendo estas más altas en los frutos transferidos a 20°C. Mientras que la variedad tuvo un efecto significativamente diferente sobre el contenido de fenoles totales y flavonoides siendo la variedad 'Regio' la que presentó el contenido más alto de estos compuestos; mientras que en el desarrollo de harinosidad, la variedad 'Criollo tardío' fue a que mostró mayor incidencia de este problema. Dentro del periodo de almacenamiento, se encontraron diferencias en las variables contenido de fenoles totales (encontrándose un incremento con el transcurso del tiempo especialmente para 'Regio') y en cuanto a conductividad se observó mayor pérdida de iones durante la primera semana de almacenamiento.

Cuadro 9. Niveles de significancia de las distintas variables involucradas en el desarrollo de oscurecimiento de frutos de durazno almacenados a 5 y 20°C.

| Variables | Tratamiento | Variedad | Tiempo(sem) |
|---------------|-------------|----------|-------------|
| P.OBS | 0.6658 | 0.2773 | 0.6673 |
| PPO | 0.0216* | 0.1272 | 0.952 |
| POD | 0.3308 | 0.3597 | 0.2674 |
| FENOLES | 0.3544 | 0.0036* | 0.0418* |
| FLAVONOIDES | 0.8694 | 0.0011* | 0.4780 |
| CONDUCTIVIDAD | 0.6840 | 0.6922 | 0.0795* |
| HARINOSIDAD | 0.0951* | 0.0032* | 0.4798 |

* Variables estadísticamente significativas

V.4.1. Cambios en variables asociadas con el oscurecimiento enzimático

V.4.1.1. Potencial de oscurecimiento

La Figura 18 muestra los cambios de absorbancia de los extractos de tejidos después de una hora en las dos variedades estudiadas mantenidas a 5°C en forma continua como de aquellas muestras transferidas de 5 a 20°C durante cuatro días adicionales.

En forma similar al experimento de daño mecánico, los duraznos 'Criollo tardío' de Aguascalientes tuvieron un mayor potencial de oscurecimiento respecto de los frutos de la variedad 'Regio' (Figura 18a). No obstante también se encontraron diferencias por efecto de su almacenamiento a 5°C; en el caso de 'Criollo tardío' las muestras almacenadas en forma continua a 5°C mostraron un mayor potencial de oscurecimiento (Δ Abs 0.179 en promedio con un máximo de 0.45 después de la primer semana de almacenamiento) respecto de aquellas transferidas a 20°C (Δ Abs 0.145 promedio con un máximo de 0.33 la segunda semana de almacenamiento), comportamiento diferente para la variedad 'Regio' de Michoacán, que a 5°C en forma continua tuvo una Δ Abs de 0.090 mientras que

las muestras transferidas a 20°C este valor fue de 0.194 con un máximo de 0.28 la segunda semana de almacenamiento (Figura 18 b).

Las disminuciones posteriores a los máximos encontrados no significan que el tejido perdió su capacidad para oscurecerse; esto ocurrió debido a que durante el análisis se compara el valor inicial de la muestra con el valor obtenido después de una hora de reposo de las celdas de medición; después de los periodos de almacenamiento las muestras podrían estar oscurecidas con lo que la diferencia de absorbancia después del tiempo de reposo ya no eran tan diferentes dando como resultado pequeñas diferencias y por lo tanto potenciales de oscurecimiento menores. Por ello el valor inicial podría ser una medida más real de este factor para comparar las variedades aunque los incrementos posteriores también indican capacidades específicas para oscurecerse de cada uno de los materiales.

De acuerdo con lo anterior, al inicio del almacenamiento 'Regio' tuvo un mayor potencial de oscurecimiento respecto de 'Criollo tardío'. No obstante, a medida que transcurren las primeras dos semanas de almacenamiento este último mostró una mayor capacidad para oscurecerse.

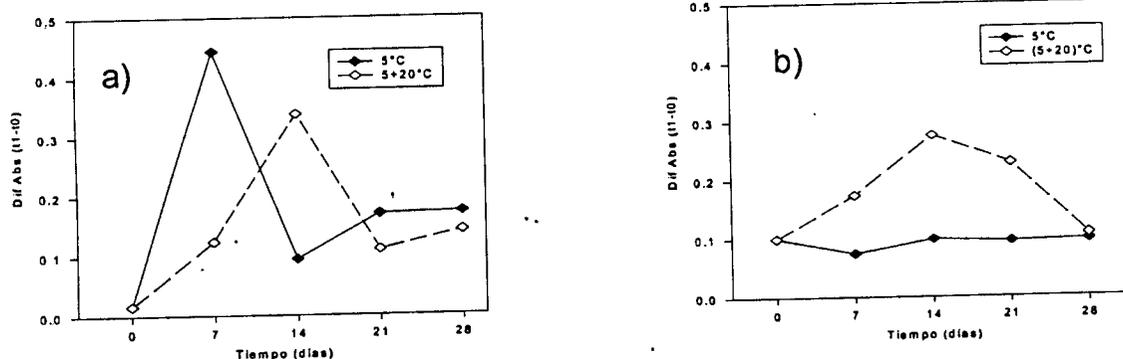


Figura 18. Cambios en el potencial de oscurecimiento en dos variedades de duraznos almacenados a 5°C y sus respectivas transferencias a 20°C: a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio'.

V.4.1.2. Actividad Enzimática (PPO y POD)

Las Figuras 19 a y b muestran los comportamientos de las actividades de PPO y POD en las dos variedades de durazno estudiadas cuando fueron sometidas a almacenamiento refrigerado a 5°C durante cuatro semanas y sus correspondientes transferencias a 20°C. Las actividades de PPO fueron muy bajas en comparación con POD para las dos variedades consideradas; no obstante, si se logró observar una mayor actividad de polifenol oxidasa para aquellos frutos que fueron transferidos de 5 a 20°C. En la variedad 'Criollo tardío' el incremento del potencial de oscurecimiento observado durante la primer semana no es explicado por los incrementos de PPO mientras que para el caso de 'Regio' los incrementos del potencial de oscurecimiento solo son parcialmente explicados por los incrementos de la actividad de esta enzima.

En forma contrastante con PPO, la actividad de POD fue notablemente mayor. La variedad 'Criollo tardío' fue la que presentó mayor actividad, los frutos almacenados en forma continua a 5°C mostraron un incremento durante la primera semana de almacenamiento para posteriormente mantenerse constante las siguientes tres semanas; mientras que los frutos transferidos de 5 a 20°C mostraron un incremento constante durante todo el almacenamiento alcanzando un valor máximo después de cuatro semanas de almacenamiento (28 357 UA/gpf).

Para el caso de la variedad 'Regio' la actividad inicial de esta enzima fue más alta (12 720 UA/gpf) que la mostrada por 'Criollo tardío' (6 125 UA/gpf), no obstante, el comportamiento posterior fue diferente respecto de esta variedad puesto que 'Regio' mostró decrementos durante su almacenamiento a 5°C así como con sus respectivas transferencias a 20°C; aunque también se pudo observar una mayor actividad para los frutos que fueron transferidos a 20°C. Se podría decir que la actividad de esta enzima, en esta variedad, no explica completamente los incrementos que se muestran en el potencial de oscurecimiento de las muestras que son transferidas a 20°C.

Los resultados sugieren que el proceso de oscurecimiento en las dos variedades y durante el estrés de frío parece tener explicaciones distintas ya que en la variedad 'Criollo tardío' su incremento del potencial de oscurecimiento parece ser explicado a través de la participación de la enzima peroxidasa mientras que en el caso de la variedad 'Regio' lo parece explicar mas la actividad de la enzima polifenol oxidasa.

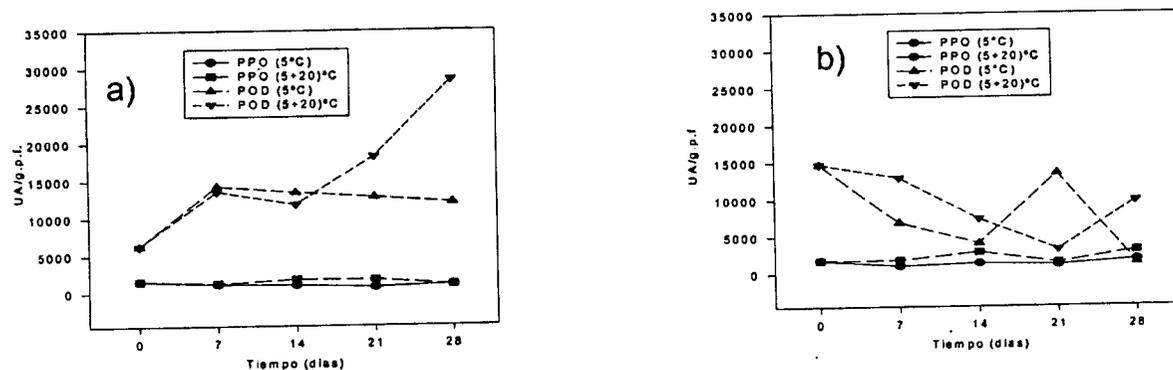


Figura 19. Actividad enzimática de polifenol oxidasa y peroxidasa en frutos de durazno de la variedad: a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio', sujetos a almacenamiento de 5°C y (5+20)°C durante 4 semanas.

V.4.1.3. Contenido de fenoles totales

Debido a la amplia variabilidad de resultados encontrados en los distintos muestreos no fue posible determinar un comportamiento claro en el contenido de fenoles totales dentro de la variedad 'Criollo tardío' (Figura 20a), mostrando valores promedio de 1.43 y 1.64 mg de ácido cumárico/gpf para frutos almacenados en forma continua a 5°C como para los transferidos a 20°C, respectivamente.

Para el caso de la variedad 'Regio' también la variabilidad mostrada no permitió observar diferencias en los frutos almacenados a 5°C con sus transferencias a 20°C y los valores mostrados durante el almacenamiento fueron parecidos al valor inicial (1.89mg.ác.cumárico/gpf). Para los frutos almacenados a 5°C en forma continua mostraron un incremento constante hasta llegar a un máximo en la semana 4 de almacenamiento con un valor de 2.11 mg de ácido cumárico/gpf (Figura 20b). De acuerdo con estos datos se puede inferir que esta variedad mostró mayor contenido de fenoles durante su almacenamiento respecto de la variedad 'Criollo tardío'.

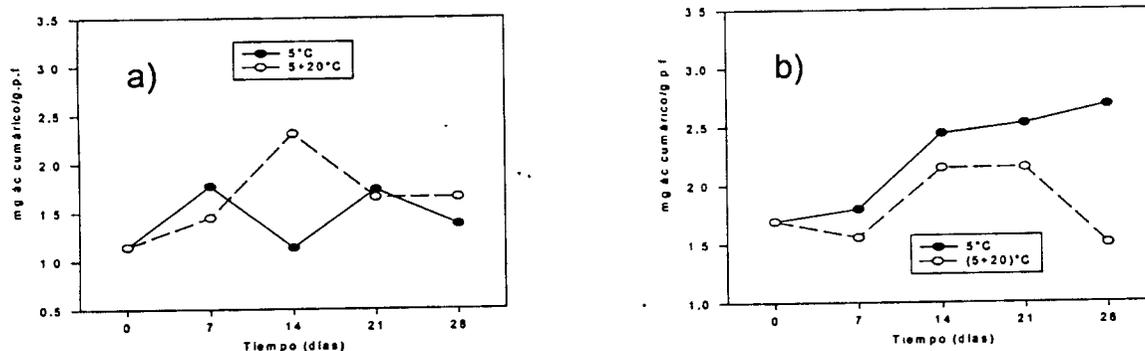


Figura 20. Contenido de fenoles totales en frutos con almacenamiento refrigerado durante 4 semanas a 5°C y (5+20°C) del cultivar: a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio'.

V.4.1.4. Caracterización parcial de fenoles por HPLC

Las Figuras 21 y 22, muestran cromatogramas representativos de los fenoles separados por HPLC de cada una de las variedades estudiadas sometidas a 5°C en forma continua como sus respectivas transferencias a 20°C. Durante el almacenamiento el número de picos detectados no cambió en todo el periodo y solo se observaron cambios en la absorbancia de los mismos indicándose con esto que no se sintetizan nuevos fenoles por efecto del estrés de frío y solo se activa la síntesis de los fenoles constitutivos del fruto. Por el tamaño de los picos se aprecia que dos compuestos fueron importantes en la composición; por la comparación de su tiempo de retención y su espectro de absorción con estándares comerciales, se identificaron como ácido clorogénico y catequina.

Calculándose las concentraciones de esos dos compuestos identificados y representándose gráficamente se observaron los cambios que estos presentan bajo las condiciones de estudio. En la variedad 'Criollo tardío' almacenado a 5°C en forma continua, el contenido de ác. clorogénico tendió a incrementarse hasta tres semanas de almacenamiento (0.4 µg de ácido clorogénico/g.p.f.) mientras que para los frutos que fueron transferidos a 20°C estos disminuyeron durante el almacenamiento (0.05 µg/gpf); para el caso de la catequina, las concentraciones también se incrementaron durante las tres primeras semanas.

La variedad 'Regio' mostró, al inicio del experimento, un alto contenido de ác. clorogénico (Figura 23b), el cual disminuyó durante la primera semana y se mantuvo sin cambios en las siguientes tres semanas. El contenido inicial de catequina, también fue mayor que la variedad 'Criollo tardío' y también disminuyó la primera semana de almacenamiento refrigerado y se mantuvo casi constante las siguientes tres semanas del periodo de almacenamiento (Figura 23a). También en este caso el contenido de estos compuestos no explica completamente el proceso de oscurecimiento que muestran estos frutos.

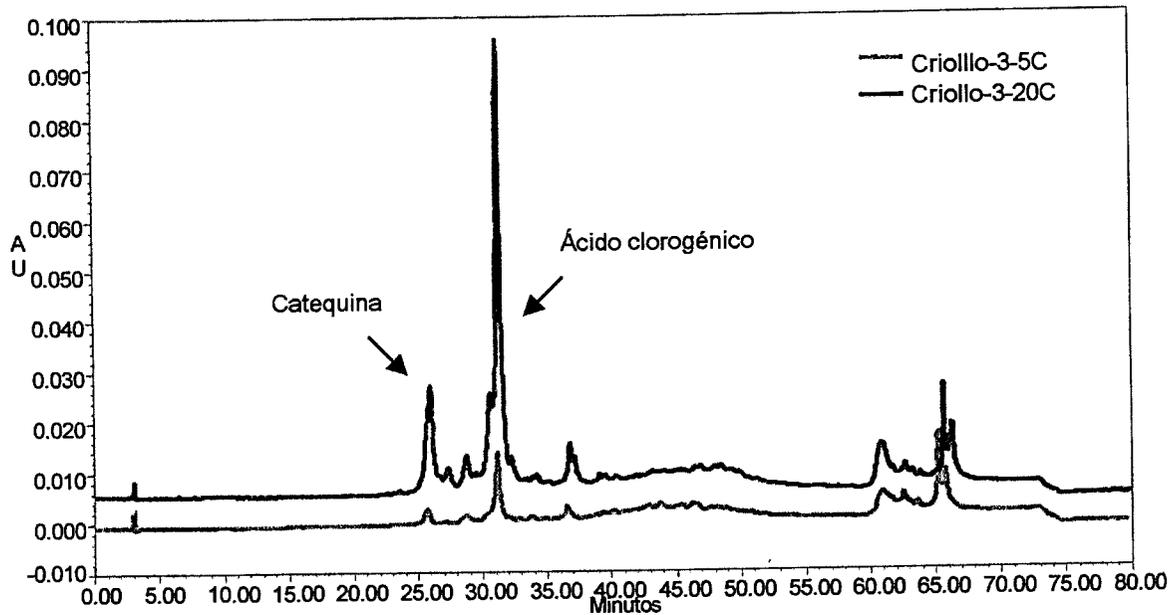


Figura 21. Cromatograma de extractos fenólicos de pulpa de duraznos del cultivar 'Criollo tardío' almacenados 3 semanas a 5°C y transferidos de 5 a 20°C.

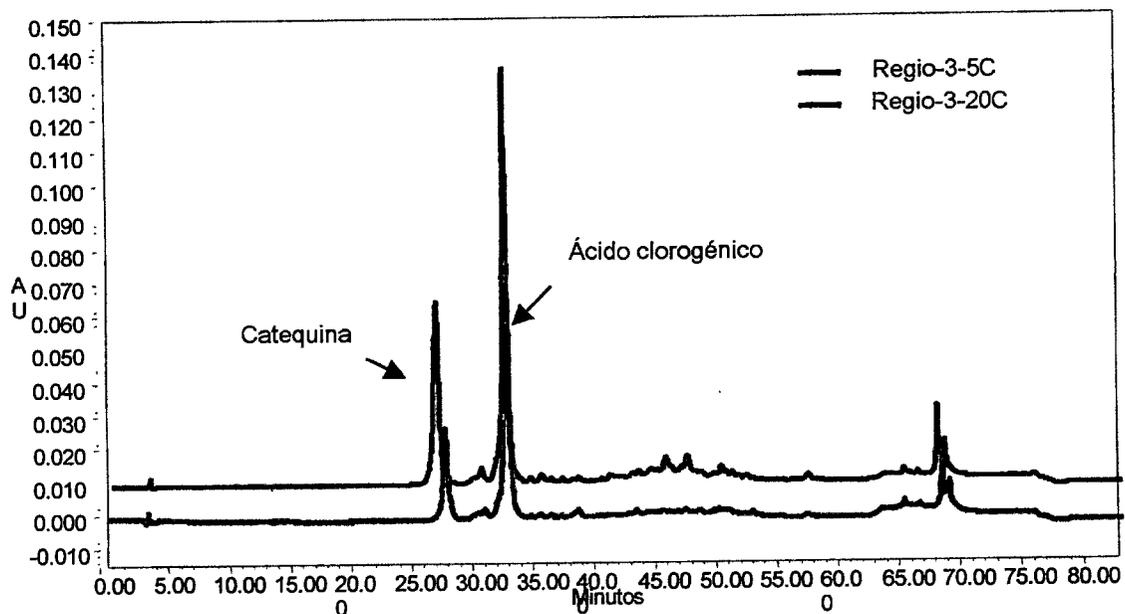


Figura 22. Cromatograma de extractos fenólicos de pulpa de duraznos del cultivar 'Regio' almacenados durante 3 semanas a 5°C y transferidos a 20°C.

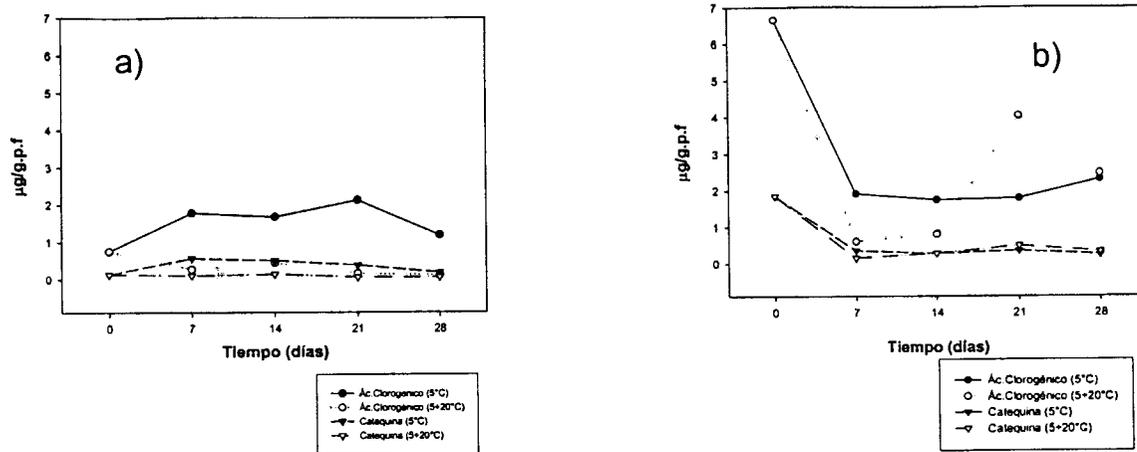


Figura 23. Contenido de ácido clorogénico y catequina en frutos de durazno: a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio' sometidos a temperaturas de 5°C y (5+20)°C durante 28 días.

V.4.1.5. Contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides fue diferente entre las dos variedades estudiadas (Figura 24). La variedad 'Criollo tardío' almacenada en forma continua a 5°C mostró un incremento constante durante todo el almacenamiento, alcanzando sus valores máximos en la cuarta semana (0.79 mg catequina/gpf) mientras que los frutos almacenados por dos semanas a 5°C y después transferidos a 20°C mostraron valores mayores que las muestras conservadas a esa misma temperatura en forma continua; después de ese tiempo los valores disminuyen a los valores iniciales (0.48 mg catequina/gpf). Para el caso de la variedad 'Regio', el contenido inicial de estos compuestos fue mucho mayor (2.3 mg catequina/gpf) a partir del cual hubo una disminución durante la primera y segunda semanas de almacenamiento para posteriormente incrementarse en ambas condiciones de almacenamiento.

El contenido de flavonoides en las dos variedades solo explicó parcialmente el comportamiento del potencial de oscurecimiento por lo que también se espera una mejor explicación del fenómeno con mayor trabajo de investigación.

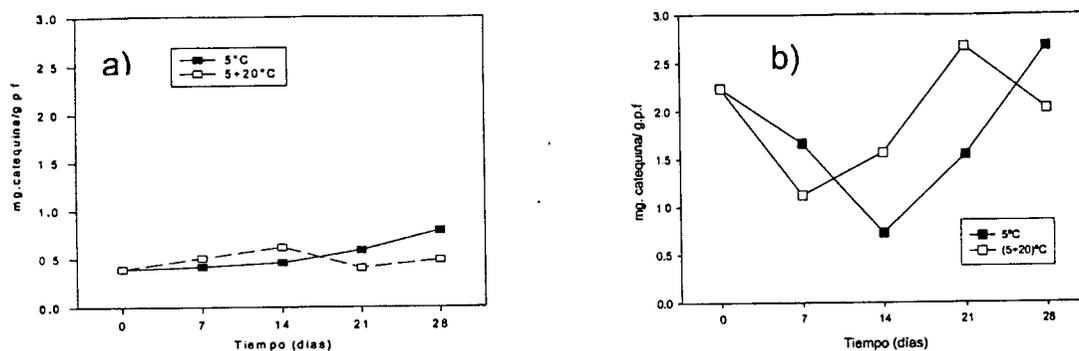


Figura 24. Cambios en el contenido de flavonoides en frutos de: a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio' sujetos a almacenamiento refrigerado durante 28 días.

V.4.2. Variables asociadas indirectamente con el oscurecimiento

V.4.2.1. Conductividad

En la Figura 25 se observa la pérdida de iones manifestada por la variedad 'Criollo tardío' fue mayor que la presentada por la variedad 'Regio', y que 'Criollo tardío', tuvo su mayor pérdida de iones después de dos semanas de almacenamiento a 5°C, mientras que los frutos transferidos a 20°C de esta misma variedad tuvieron su mayor pérdida durante la primer semana, siendo el mismo valor alcanzado en diferente periodo de tiempo (90% conductividad total).

Este mismo comportamiento se presentó para la variedad 'Regio', es decir, los frutos mantenidos a 5°C, tuvieron mayor porcentaje de conductividad manifestada en la segunda semana, mientras los frutos control la presentaron durante la primer semana y también alcanzaron valores semejantes siendo el control en que sufriera mayor pérdida de en menor lapso de tiempo (80% conductividad total).

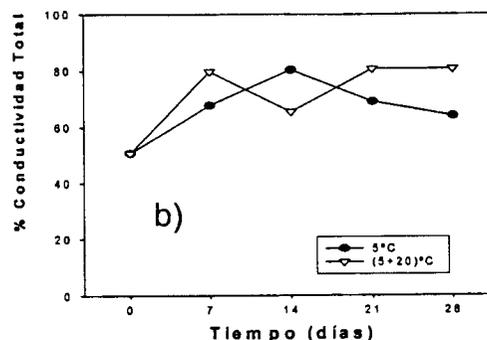
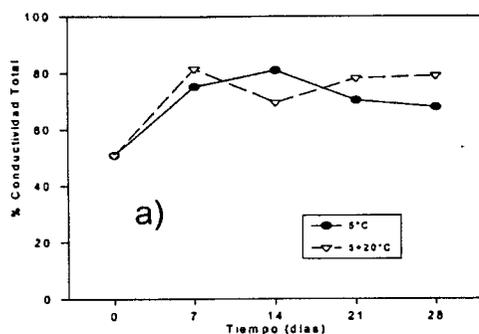


Figura 25. Porcentaje de conductividad total manifestada por frutos de la variedad a) 'Criollo tardío' y b) 'Regio' almacenados a 5°C y sus respectivas transferencias a 20°C.

V.4.2.2. Harinosidad

La Figura 26 muestra los gramos de sobrenadante extraído de pulpa de durazno sometida a refrigeración durante cuatro semanas a 5°C; un valor alto indica que los frutos están más jugosos y lo contrario indica que estos han perdido esta característica y por tanto su calidad. Esta propiedad también está asociada al daño por frío. En ambos cultivares se tuvo más sobrenadante (alrededor de 0.4 g/g pulpa) en los frutos almacenados a 5°C en forma continua. Los frutos que fueron transferidos de 5 a 20°C mostraron disminuciones en ambas variedades, siendo más pronunciada para la variedad 'Criollo tardío' el cual alcanzó valores de 0.02 g/g de pulpa después de haber sido almacenado durante cuatro semanas. Para la variedad 'Regio' disminuyó a su menor valor en la tercera semana (0.25 g/g pulpa).

Como puede observarse, la pérdida de jugosidad de los frutos no se manifiesta hasta que los frutos son llevados a temperaturas superiores a la de refrigeración por lo que es evidente que este desorden fisiológico es inducido por las altas

temperaturas de la transferencia; pero sin embargo, existe un umbral de tiempo para que este problema se manifieste que en este caso fue de dos semanas lo cual puede ser el límite de almacenamiento para estas variedades a la temperatura de 5°C.

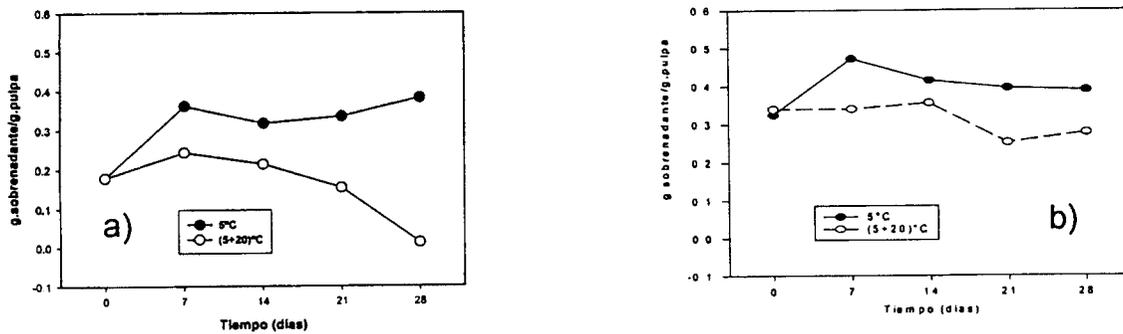


Figura 26. Desarrollo de harinosidad en duraznos de dos variedades almacenadas durante 28 días a 5°C y sus transferencias a 20°C: a) 'Criollo tardio' y b) 'Regio'.

V.5. Efecto de antioxidantes e inhibidores de actividad de PPO

V.5.1. Estudios "in vitro"

Los extractos de PPO y POD de la variedad 'Criollo tradío' fueron utilizados para estudiar los niveles de inhibición de esta enzima in vitro frente a distintas concentraciones de agentes inhibidores: Se utilizaron como inhibidores el ácido benzoico, ácido ascórbico, cisteína, cloruro de sodio, 4 hexil resorsinol y una mezcla de ácido ascórbico cisteína en concentraciones de 1 a 5 mM.

En el Cuadro 10, cada valor representa el porcentaje de inhibición promedio de las 3 mediciones realizadas por experimento, se observa que los agentes inhibidores de la actividad de PPO y POD que resultaron ser más efectivos a todas las concentraciones probadas para ambas enzimas fueron el ácido ascórbico, cisteína, y 4 hexilresorcinol, así como la mezcla ácido ascórbico-cisteína aunque para el caso de PPO, el efecto inhibitorio de ésta mezcla disminuyó ligeramente a partir de la concentración 3 mM.

El ácido benzoico junto con cloruro de sodio presentaron los menores efectos inhibitorios (5-10%) sobre la actividad de ambas enzimas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se eligió el ácido ascórbico, cisteína y 4 hexil resorsinol para realizar los estudios in vivo.

Cuadro 10. Inactivación "In vitro" con distintos agentes antioscurecimiento.

| Agente antioscurecimiento | Conc (nM) | % Inactivación (PPO) | % Inactivación (POD) |
|---------------------------|-----------|----------------------|----------------------|
| Ác. benzoico | 1 | 15.8 | 9.9 |
| | 2 | 31.0 | 29.1 |
| | 3 | 31.0 | 32.3 |
| | 4 | 49.3 | 45.0 |
| | 5 | 54.0 | 40.0 |
| Ác. ascórbico | 1 | 100 | 100 |
| | 2 | 100 | 100 |
| | 3 | 100 | 100 |
| | 4 | 100 | 100 |
| | 5 | 100 | 100 |
| Cisteína | 1 | 100 | 100 |
| | 2 | 100 | 100 |
| | 3 | 100 | 100 |
| | 4 | 100 | 100 |
| | 5 | 96.0 | 100 |
| Cloruro de sodio | 1 | 14.8 | 11.0 |
| | 2 | 19.7 | 11.6 |
| | 3 | 38.0 | 20.7 |
| | 4 | 40.0 | 27.9 |
| | 5 | 41.3 | 32.8 |
| Ác. asc/cisteína | 1 | 100 | 100 |
| | 2 | 100 | 100 |
| | 3 | 99.4 | 100 |
| | 4 | 99.3 | 100 |
| | 5 | 98.4 | 100 |
| 4-hexil resorcinol (4-hr) | 1 | 100 | 100 |
| | 2 | 100 | 100 |
| | 3 | 100 | 100 |
| | 4 | 100 | 100 |
| | 5 | 100 | 100 |

VI.5.2. Estudios “in vivo”

Los procedimientos empleados in vivo fueron 3:

- 1) Inmersión de frutos de durazno en una solución de ácido ascórbico 10 mM durante 30 min a 1°C.
- 2) Infiltración al vacío en solución de ácido ascórbico y cisteína 10 mM durante 5, 10 y 15 minutos.
- 3) Tratamiento térmico a 50°C durante 3, 6 y 9 minutos.

Las aplicaciones de los distintos inhibidores de PPO fueron llevados a cabo disolviendo cada uno de los compuestos en agua para dar concentraciones 10 mM de cada uno de ellos, (a excepción del 4-hexil-resorcinol el cual se preparó a una concentración 3 mM), y después se llevaron a una cámara de vacío durante 5, 10 y 15 minutos teniendo como control un sistema similar con agua sin el compuesto en estudio. Después de los tratamientos los frutos fueron lavados y secados con franela y puestos a 20°C para después analizar su actividad de PPO y POD en la piel de los frutos durante tres días consecutivos.

El Cuadro 11, concentra los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos. La concentración utilizada para los estudios de infiltración fue 10 veces mayor que la más alta utilizada en los estudios in vitro. No obstante, ninguno de los compuestos utilizados logró inhibir completamente la actividad de ambas enzimas en contraste con lo obtenido en los estudios in vitro también se observó que los tiempos más largos de tratamiento provocaron daños superficiales a los frutos lo cual limitó su aplicación; esta misma observación se tuvo para los frutos tratados térmicamente los cuales mostraron daños con tiempos de 6 minutos a 50°C.

Para los duraznos tratados con ácido ascórbico a presión atmosférica la inhibición lograda fue baja y esta se perdió (se reactivó la enzima) conforme transcurrieron

los días de almacenamiento, ya que para PPO, se pasó de 29% a 0%, y para POD pasó de 21.5% el primer día a 0% después de tres días. Esta limitada inhibición y el largo tiempo de tratamiento señalan lo inaplicable de este tratamiento en la práctica.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición de la actividad de PPO y POD en duraznos 'Criollo tardío' sometidos a inmersión, infiltración a vacío y tratamiento térmico.

| Compuesto | Tiempo (min) | % PPO/día | | | % POD/día | | |
|----------------------------|--------------|-----------|------|------|-----------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Ác. ascórbico * | 30 | 29.0 | 5.2 | 0.0 | 21.5 | 0.0 | 0.0 |
| | 5 | 29.0 | 33.1 | 24.5 | 17.2 | 6.7 | 20.6 |
| Ác. ascórbico | 10 | 0.0 | 14.6 | 16.2 | 28.8 | 28.0 | 43.8 |
| | 15 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.8 | 24.3 | 47.0 |
| Cisteína | 5 | 23.8 | 0.0 | 0.0 | 13.4 | 20.7 | 4.7 |
| | 10 | 18.6 | 17.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 14.7 |
| 4-Hexil resorcinol | 15 | 1.2 | 49.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 14.0 |
| | 5 | 45.8 | 37.4 | 16.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 10 | 57.1 | 61.2 | 43.2 | 0.0 | 5.2 | 12.3 |
| | 15 | 64.3 | 57.1 | 31.5 | 5.3 | 26.3 | 23.7 |
| Tratamiento térmico (50°C) | 3 | 0.0 | 46.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 6 | 0.0 | 33.3 | 33.0 | 0.0 | 0.0 | 2.6 |
| | 9 | 0.0 | 32.3 | 39.0 | 0.0 | 2.6 | 3.0 |

* Inmersión en solución de ác. Ascórbico; cada valor representa el % de inhibición promedio de las tres mediciones realizadas por experimento.

El tratamiento de infiltración a vacío con ácido ascórbico no mostró un patrón de comportamiento lógico ya que para PPO, el tratamiento de 5 minutos fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición pero al aumentar el tiempo de tratamiento se encuentra una reactivación de la misma lo cual resulta difícil de explicar, en tanto que para POD hay cierta tendencia lógica respecto del tiempo de tratamiento y la inhibición incrementa con el transcurso del tiempo de almacenamiento lo cual sugiere que el mecanismo de inhibición en ambos casos puede ser diferente.

La cisteína, a los cinco minutos de tratamiento, tuvo porcentajes limitados de inhibición para ambas actividades y mostró reactivación de las enzimas conforme aumentó el tiempo de tratamiento y de almacenamiento. Sin embargo, el dato que se sale de este comportamiento (49%) se presentó en el tratamiento de 15 minutos después de dos días de almacenamiento sin que se tenga una explicación de este comportamiento.

De las soluciones con compuestos antioscurecimiento probados el 4-hexilresorcinol fue el que tuvo mayores valores de inhibición para PPO, alcanzando el máximo valor (64.3%) después de 15 minutos de tratamiento con la solución inhibidora. En contraste a los anteriores compuestos, el comportamiento mostrado por este compuesto tuvo una tendencia esperada ya que la inhibición se incrementó con el tiempo de tratamiento y disminuyó con el tiempo de almacenamiento. Para POD los tratamientos de 5 y 10 minutos no inhibieron la actividad y después de 15 minutos se registró una inhibición de 23.7% después de tres días de almacenamiento.

El tratamiento térmico, sólo mostró efectos parciales de inhibición en PPO, ya que en POD los efectos fueron nulos. Respecto del efecto sobre PPO, este tratamiento indicó que la actividad después de un día de almacenamiento no se vio afectada en cambio después de dos días de almacenamiento los porcentajes de inhibición se incrementaron a valores de 32 y 47% indicando que este tratamiento tiene sus efectos en forma retrazada y que probablemente este efecto no sea directamente sobre la enzima presente al momento de aplicar el tratamiento térmico o que el mecanismo de inhibición in vivo puede ser diferente al observado in vitro. De forma interesante los frutos tratados durante tres minutos mostraron un reactivación de la actividad después de tres días de almacenamiento lo cual apoya lo dicho anteriormente acerca del mecanismo de inhibición.

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Caracterización de diferentes cultivares del Centro del País

Como se describió en la sección de resultados, no se encontraron valores de referencia entre las variables medidas para indicar la susceptibilidad al oscurecimiento. Aunque el análisis estadístico de agrupamiento nos muestra que el factor actividad de PPO es importante dentro del proceso. No obstante, la gran variabilidad de resultados permite inferir que el problema es más complejo de lo que pareciera. Esta variabilidad de resultados también ha sido reportada por diferentes investigadores. Lee y *col.*, (1990), describen una amplia variabilidad de actividades de PPO en duraznos producidos en Nueva York, aunque indicaron que ésta se correlacionó con el oscurecimiento (medido como el cambio del valor L*) especialmente dentro de una misma variedad lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo, Cheng y Crisosto, (1995) también analizan la actividad de PPO, el contenido de fenoles totales y la participación de distintos compuestos fenólicos y los relacionan con el potencial de oscurecimiento (medido como el cambio de absorbancia a 420 nm después de 1 o 5 horas de incubación); indicando que tanto el contenido de fenoles como la actividad de PPO tienen poca relación con el proceso de oscurecimiento.

Las amplias variaciones en los resultados pueden deberse a diferencias en cuanto al origen genético de los materiales utilizados así como a la región en la que se cosechó, condiciones ambientales y estado de desarrollo de los frutos (Marqués y *col.*, 1995). Respecto a este último factor se sabe que el contenido de fenoles y la actividad de PPO disminuyen con la maduración de los mismos (Macheix y *col.*, 1990); para evitar este problema se procuró utilizar frutos que se encontraban en un estado de madurez de consumo.

No se conoce cuáles son los cambios de las actividades de esta enzima y de los compuestos fenólicos dentro del proceso de desarrollo en las variedades de

durazno producidas en el país. No obstante, Luh y Phithakpol, (1972), realizaron mediciones de PPO en durazno de la variedad 'Halford' (durazno de hueso pegado) en distintos estados de maduración (inmaduro, maduro para enlatado y sobre maduros); encontrando que las actividades en duraznos inmaduros y maduros para enlatado no fueron muy diferentes entre sí mientras que el sobremaduro mostró una menor actividad pero no tan diferente como las disminuciones que se han reportado para el caso de duraznos de hueso despegado de la variedad 'Salvey' de Israel (Harel y col., 1970).

Si lo reportado por Luh y Phithakpol, (1972) se aplicara a nuestras variedades, podría indicarse que el estado de madurez no tendría un efecto importante para las actividades encontradas y por lo tanto la variación en sus valores es debida a las características genéticas de los materiales y probablemente a las condiciones ambientales y de cultivo donde se desarrollan los frutos.

Hansche y Boynton, (1986), al conducir un estudio en el que midieron la variación en el contenido de fenoles y actividad de PPO en 42 variedades de durazno del Estado de California, concluyeron que las diferencias observadas en ambos parámetros estaban determinadas genéticamente; sugiriendo que los genes segregados juegan un papel preponderante.

No obstante esta variabilidad, varios autores afirman que midiendo los factores involucrados en el oscurecimiento se podría tener una idea de la tendencia hacia el oscurecimiento de distintas frutas (Vámos-Vigázó, 1981; Coseteng y Lee, 1987; Lee y col., 1990; Larrigaudiere y col., 1998 y Jiang, 2000, entre otros). Este aspecto no fue posible observarlo en este estudio.

Un aspecto importante a señalar es que en el presente estudio, se analizaron las actividades de PPO en la fracción soluble y no se midieron estas en la fracción particulada. Harel y col., (1970) indicaron que las actividades en esta fracción se incrementaron desde el primero hasta el cuarto mes de desarrollo con una súbita

en forma subjetiva a través de una escala del desarrollo de color propuesta. Aunque se indica el diámetro de los discos de tejido que deben tomarse, no se indica si es importante o no considerar el tamaño de los frutos y por lo tanto si influye o no la profundidad del tejido que se analiza. Durante el desarrollo del experimento se midió la actividad de la enzima PPO tanto en piel como en pulpa observándose que la actividad fue notablemente mayor en la piel (Figura 5), por lo que se puede apreciar es posible que exista un factor de variabilidad atribuible al método aplicado.

Quizás basados en estos problemas Lee y col., (1990) deciden evaluar este potencial de oscurecimiento midiendo el cambio del valor de color L^* al tiempo 0 y después de una hora en un puré de pulpa con agua destilada. Los datos que muestran estos investigadores en distintas variedades también indican que no hubo una correlación adecuada entre el oscurecimiento y la actividad de PPO o el contenido de fenoles. Por su parte Cheng y Crisosto (1995), probablemente basados en experiencias propias acerca del nivel de actividad de PPO en la piel (Crisosto y col., 1993), miden el potencial de oscurecimiento utilizando la piel como fuente del extracto enzimático; no obstante también se presentaron problemas de falta de correlación en algunas variedades, por ejemplo una variedad de nectarinas ('Flaming Red') mostró un potencial de oscurecimiento bajo aún cuando su actividad de PPO y el contenido de fenoles totales fue alta, explicando que este comportamiento se debió al bajo contenido de ácido clorogénico; sin embargo, otras variedades por ellos reportadas, parecen contradecir estos aspectos. Con lo anterior estos investigadores plantean que no sólo es la actividad de la enzima o la cantidad de fenoles o el sitio donde se lleva a cabo la reacción si no también el tipo de fenoles que contenga el fruto.

Al igual que lo reportado por Cheng y Crisosto (1995), para el caso de nectarinas; la variedad 'Regio' tuvo alto contenido de fenoles, de ácido clorogénico y de flavonoides y una actividad de PPO parecida a la mostrada por 'Criollo tardío' pero su potencial de oscurecimiento fue menor. Estos resultados parecen mostrar la

necesidad de seguir mejorando la metodología para estimar ese potencial de oscurecimiento de una forma más precisa y de mayor poder de predicción. Posiblemente uno de los aspectos a considerar en este desarrollo es el incluir dentro de los extractos obtenidos la fracción de PPO que se encuentra en la fracción particulada del tejido, puesto que Harel y col., (1970) indican que ésta actividad se encuentra incrementada al final de los procesos de maduración y previos a la madurez comercial. También es posible que en este método se produzcan problemas de dilución en la extracción que dificultarían ver claramente las diferencias de absorbancia en cada una de las muestras.

Los cambios de las actividades enzimáticas en frutos dañados y control indicaron que posiblemente PPO tenga un papel parcial y no fundamental en el proceso de oscurecimiento de los frutos ya que los niveles de actividad fueron muy parecidos y sin embargo el oscurecimiento fue evidente en los frutos dañados. No obstante, podría argumentarse que este oscurecimiento se presenta sólo por la descompartamentación de los factores involucrados. Esto parece ser lógico; sin embargo, la observación de las curvas de potencial de oscurecimiento muestran que éste se incrementa con el tiempo y también hay incrementos de ácido clorogénico y de la actividad de peroxidasa, llamando la atención esta enzima como un posible factor responsable del oscurecimiento.

Feippe y col., (2001), publicaron un trabajo con duraznos de pulpa blanca en el que evaluaron las actividades de PPO y POD indicando que estas enzimas estuvieron implicadas en el desarrollo de oscurecimiento. Nuestros resultados para la variedad 'Pulpa blanca' de Aguascalientes, indicaron baja actividad de PPO y bajo contenido de fenoles y flavonoides pero su oscurecimiento fue muy alto; si correlacionamos estos resultados con los de Feippe, podría sugerirse que POD puede estar participando de forma activa en el oscurecimiento aun cuando en esta variedad no fue medida.

Nicolas y *col.*, (1994); Richard-Forget y Gaillard,(1997), indicaron que la función primaria de las peroxidasas es oxidar a donadores de hidrógeno a expensas de peróxidos pero que también aceptan otros donadores de hidrógeno (como los polifenoles) que hace posible la oxidación de los derivados del ácido hidroxicinámico y flavanos los cuales están implicados en el oscurecimiento enzimático. Estos últimos autores aportaron datos experimentales de sistemas in vitro en los cuales comprueban que la (-) epicatequina es degradada por la acción de PPO generando un alto contenido de H_2O_2 , el cual es utilizado por POD para promover la oxidación del fenol. Sin embargo, para el caso del ácido clorogénico, el H_2O_2 formado fue menor; por lo que a través de otro experimento sugirieron que las quinonas, previamente formadas por la acción de PPO, son utilizadas por POD como peroxisustrato para continuar con la oxidación de los compuestos fenólicos, aunque no establecen el mecanismo de la reacción. Lo anterior establece una conexión entre las dos enzimas durante el desarrollo del oscurecimiento.

Strack, (1997), señaló también que POD puede ser la enzima que cataliza la oxidación de los flavonoides, y que una manifestación de este proceso es la aparición de 'sustancias oscuras' en tejidos dañados debido al ataque de patógenos o senescencia. Además indica, que por la baja especificidad de POD hacia sus sustratos, así como las características estructurales de los flavonoides, se ha atribuido a POD su degradación, proceso durante el cual se forman hidroxibenzoatos, a partir de los anillos A y B de los flavonoides.

En base a los trabajos mencionados anteriormente, y de acuerdo a nuestros resultados se puede sugerir que POD parece estar involucrada en el proceso de oscurecimiento generado por el daño mecánico.

Dixon y Paiva, (1995), reportaron que muchos compuestos fenilpropanoides son inducidos en plantas, como respuesta a algún tipo de daño mecánico (cortaduras, golpes o por el consumo de los animales herbívoros), y que el incremento en los

niveles de cumestrol y cumarina son tóxicos potenciales para los herbívoros, generando efectos estrogénicos y anticoagulantes. El ácido clorogénico, esteres de alquil-ferulato, así como esteres de fenoles unidos a pared celular son inducidos por golpes o magulladuras y actúan directamente como compuestos de defensa o precursores de la síntesis de lignina, suberina y otras barreras polifenólicas inducidas por magulladuras; esto parece comprobarse con la variedad 'Regio' que mostró altos contenidos de ácido clorogénico en los frutos dañados.

Al efectuar la identificación de fenoles en la pulpa de los frutos de las dos variedades almacenados durante 4 días a 20°C, se determinó la presencia de ácido clorogénico y catequina, encontrándose el primero en mayor proporción y ambos en mayor contenido en la variedad 'Regio' que en 'Criollo Tardío'. La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos del durazno mediante el equipo de Cromatografía de alta resolución ha sido reportada por diversos autores, para otras variedades de durazno, entre las que se encuentran 'Red haven' y 'South haven', variedades en las que se ha identificado la presencia de ácido clorogénico, neoclorogénico y 3-p-cumáoilquinico, siendo el primero el que se encuentra en mayor proporción (Möller y Herrmann, 1983).

El ácido clorogénico y catequina se han identificado como los principales constituyentes fenólicos en zumo de durazno de la variedad 'Desert Gold' (Van Gorsel y col., 1992), así como de muchas otras frutas (Macheix y col., 1990).

Macheix y col., (1990) señalaron que el ácido clorogénico es un buen sustrato para las polifenol oxidasas y que en chabacano se degrada rápidamente durante el procesamiento. De acuerdo a lo reportado por Radi y col., (1997), las variedades de chabacano con mayor contenido de ácido clorogénico se oscurecen en mayor proporción. Esto fundamentaría la idea que el mayor contenido de ácido clorogénico en 'Regio' lo propone como candidato a experimentar una mayor

tendencia al oscurecimiento; situación que no se manifiesta por lo que se considera que el proceso de oscurecimiento es mucho más complejo.

Una posible explicación al hecho de que 'Regio' no muestre un mayor oscurecimiento podría estar en la participación de las reacciones acopladas entre los flavonoides y los ácidos fenólicos. En sistemas modelo de ácido clorogénico/epicatequina o catequina se ha observado que la velocidad de oxidación del flavonoide se incrementa mientras el ácido fenólico se degrada en menor proporción. Esto se explica a través de dos reacciones, en una primera hay una oxidación enzimática, a través de PPO, del ácido clorogénico formándose una quinona del mismo; en una segunda reacción acoplada a esta, el flavonoide se oxida químicamente (pues no es un buen sustrato para PPO) formando su quinona y regenerando el ácido clorogénico inicial (Richard-Forget y col., 1995). El flavonoide se puede consumir por reacciones de condensación formando copolímeros entre el mismo o con el ácido clorogénico a los cuales se les ha identificado con propiedades de inhibidor competitivo de la polifenol oxidasa; de acuerdo con esto, la variedad 'Regio' con un mayor contenido de ácido clorogénico podría oxidarse este por PPO y la catequina regenerarlo para posteriormente formar productos de condensación que inhibirían la posterior acción de PPO y con ello disminuir el oscurecimiento. La disminución del contenido de ácido clorogénico al final del periodo de almacenamiento podría explicar en parte la tendencia a incrementar el potencial de oscurecimiento de esta variedad.

La permeabilidad de membrana es una expresión de la libertad con la cual el agua y los solutos pueden pasar a través de la membrana y por ende miden de forma indirecta la integridad de la misma. Si se considera que el proceso de oscurecimiento es una descompartamentalización, se espera que exista una relación directa del oscurecimiento con la conductividad.

Murata (1990), señaló que la permeabilidad de membrana cambia en función de la maduración y senescencia de los tejidos de los frutos, pero también señala que algunos tejidos al ser incubados en agua presentan una permeabilidad distinta debido a un incremento súbito de ella por estar el tejido sometido a inundación; en consecuencia las determinaciones de solutos de un tejido en solución siempre están acompañadas de problemas fisiológicos o estructurales por efecto del estrés.

De acuerdo a nuestros resultados la conductividad en las células de los tejidos dañados alcanzó su máximo valor una vez transcurridas las primeras 24 horas, aunque para ambos casos se tuvo además una pérdida importante a las 72 h. Esto nos hace pensar que la mayor salida o pérdida de sustratos se presentó durante el primer día y por lo tanto se esperaría un mayor oscurecimiento en los tejidos durante este tiempo, ya que teóricamente hay contacto entre las enzimas PPO y POD y los compuestos fenólicos debido a la descompartmentalización celular, sin embargo esto al parecer no sucede ya que no se presentó correlación entre la pérdida de iones y Potencial de oscurecimiento.

VI.3. Efecto del almacenamiento refrigerado

VI.3.1. Variables asociadas con el oscurecimiento enzimático

En términos generales se conoce cuales son las condiciones óptimas de conservación del fruto de durazno indicándose que la temperatura más adecuada es 0°C que en cambio las temperaturas entre 2.2 y 5°C provocan una rápida aparición de síntomas de daño por frío en un término de dos semanas y que a 10°C estos no se presentan (Lill y col., 1989). Los síntomas característicos de este desorden en el durazno son: oscurecimiento interno de la fruta, desarrollo de harinosidad, oscurecimiento en el hueso, translucidez de la pulpa, en algunas

variedades acumulación de pigmentos, incapacidad para madurar y pérdida de sabor (Mitchell y Kader, 1989; Crisosto y col., 1999). En lo referente al término harinosidad, Ju y col., (2000) hacen la diferencia entre la harinosidad, definida como un fruto suave de textura seca con frutos que presentan pastosidad a los que definieron como frutos firmes y de textura seca, señalando que en los reportes se les ha confundido pero que en realidad son dos síntomas diferentes ya que la pastosidad presenta una firmeza mucho mayor y la actividad de ACCoxidasa, el contenido de ACC y las actividades de poligalacturonasa y galactosidasa fueron menores respecto de la fruta con harinosidad. Estos mismos autores señalan que la harinosidad se presenta en mayor grado en frutos expuestos a 5°C en tanto que "leatheriness" se presenta a 0°C y que este se presenta con mayor frecuencia en frutos de cosecha temprana y la harinosidad en frutos de cosecha tardía.

En los últimos años, los reportes acerca del problema de oscurecimiento desarrollado durante el almacenamiento refrigerado de frutos de durazno son escasos y aquellos disponibles se refieren a estudios entre variedades que ya fueron descritos en la primera sección de esta discusión. En ese ámbito, Jen y Kahler, (1974) señalaron que PPO es la enzima involucrada en las reacciones de oscurecimiento y que ésta permanece altamente activa a 3°C lo que implica que el almacenamiento a bajas temperaturas no limita su actividad. No obstante, se debe señalar que el proceso de oscurecimiento ocasionado por las bajas temperaturas en los frutos de las variedades estudiadas fue comparativamente menor que el desarrollado por el daño mecánico lo que explica el mayor énfasis que se ha puesto sobre el problema de harinosidad.

La comparación del potencial de oscurecimiento con las actividades de PPO y POD en los frutos almacenados sugieren que el proceso de oscurecimiento en las dos variedades y durante el estrés de frío puede tener explicaciones distintas ya que en la variedad 'Criollo tardío' el incremento del potencial de oscurecimiento parece ser explicado a través de la participación de la enzima peroxidasa mientras que en el caso de la variedad 'Regio' lo parece explicar más la actividad de la

enzima polifenol oxidasa. Nuevamente la indicación que hace Nicolas y *col.*, (1994) respecto de la participación de POD en los procesos de oscurecimiento parece explicar los comportamientos observados en la variedad 'Criollo tardío' pero no ocurre de esta forma en la variedad 'Regio'. El comportamiento observado fue muy parecido a lo encontrado en el daño mecánico; lo que parece subrayar la atención que debe ponerse al papel de esta enzima en el desarrollo de los procesos de oscurecimiento y ser considerada dentro de los factores que los inducen y evaluar la conveniencia de medirla en forma sistemática en los estudios de caracterización de variedades. Este aspecto esta, apoyado también por los trabajos de Alba y *col.*, (1999) quienes al hacer una separación electroforética de las proteínas del mesacarpo sujeto a procesos de lignificación, también detectaron una banda con actividad de peroxidasa; estos mismos autores mencionan que también en ese proceso está implicada una lacasa lo cual también señala la importancia de medir la actividad de esta enzima.

Respecto de los contenidos de fenoles totales y flavonoides, éstos no se correlacionaron adecuadamente con el potencial de oscurecimiento. No obstante, Radi y *col.*, (1997) trabajando con distintas variedades de chabacano indicó que el contenido de ácido clorogénico disminuyó durante el oscurecimiento pero que la susceptibilidad al oscurecimiento pareció estar más relacionada con la cantidad de flavan-3-ol (entre ellos la catequina) y que aunque el ácido clorogénico es el mejor sustrato para PPO (dependiendo del material estudiado) el desarrollo de pigmentos cafés depende principalmente del contenido de flavan-3-ol. En este mismo sentido Jiang, (2000), trabajando con frutos de lichee, encontró que la oxidación de los fenoles es mayor en presencia de antocianinas aun cuando estas no son atacadas por la polifenol oxidasa. Estos aspectos llaman nuevamente la atención respecto de que en el proceso de oscurecimiento es muy importante el tipo de fenoles que se encuentren en el sistema como lo establecen Richard-Forget y Gauillard,(1997) y Cheynier y *col.*, (1995).

Otro aspecto a considerar dentro del proceso de oscurecimiento es la forma en que se encuentran los distintos tipos de fenoles dentro del sistema; Ose y col., (1995), reportaron que en hojas de *Ipomoea aquatica* Forsk almacenadas a 1 y 20°C, hubo un mayor contenido de fenoles totales a 1°C respecto de 20°C y que al mismo tiempo se incrementó el contenido de fenoles libres (ácido clorogénico, p-cumárico, caféico, ferúlico y trans cinámico), siendo estos más reactivos y por lo tanto presumiblemente responsables del oscurecimiento. Nuestros resultados indican un incremento de fenoles totales en la variedad 'Regio' pero asociado a un decremento de ácido clorogénico; en tanto que en 'Criollo tardío' se incrementa su contenido de este fenol. Esto también puede explicar el mayor potencial de oscurecimiento mostrado por 'Criollo tardío'.

Los anteriores aspectos, resaltan el amplio espectro de factores involucrados en el proceso de oscurecimiento así como la complejidad del mismo haciendo probable que distintas especies y probablemente distintas variedades tengan mecanismos diferentes que llevan al oscurecimiento.

La falta de jugosidad es un síntoma importante de daño por frío en duraznos y se manifiesta como harinosidad, esta se ha atribuido a la presencia de sustancias metoxi-pecticas insolubles de alto peso molecular que se forman por la acción de la pectinesterasa durante el estrés de frío, dichas sustancias ligan agua libre y fluidos celulares en los espacios intercelulares (Lill y col., 1989).

La diferencia presentada en la harinosidad de ambas variedades estudiadas demuestra que aquella procedente de cosecha temprana ('Regio') es más jugosa en comparación con la que procede de cosecha tardía ('Criollo tardío'). Datos que concuerdan con lo reportado por Luza y col., (1992), quienes además indicaron que en este problema se encuentran involucrados varios factores como los cambios en el contenido de pectina total el estado de madurez, además de la temporada de cosecha ya que los cultivares tempranos o medios tienen una mayor vida de anaquel en el almacén que los tardíos y extra tardíos. También

indicaron que los cambios indeseables de la pulpa debida al daño por frío se relacionan con alteraciones del metabolismo de la pared celular.

La conductividad mostrada por ambos cultivares parece indicar que después de dos semanas de almacenamiento a 5°C no es recomendable el almacenamiento de los frutos ya que después de ese tiempo y ser transferidos a 20°C se incrementó la harinosidad de los mismos. Esta pérdida de iones está explicada en función de la pérdida de permeabilidad de las membranas que conforman los tejidos del fruto el cual está explicado por un posible cambio de fases de los lípidos que conforman a las mismas como lo indican Raison y Orr (1990) quienes identifican este cambio como una causa primaria del daño por frío.

VI.4. Efecto de los agentes antioscurecimiento

De acuerdo a los datos presentados en la sección de resultados los compuestos que inhibieron la actividad de PPO y POD fueron el ácido ascórbico, la cisteína y el 4 hexilresorcinol en todas las concentraciones utilizadas; por el contrario el ácido benzoico y el cloruro de sodio fueron los de menor poder inhibitorio, lo cual coincide con lo encontrado por Weemaes y *col.*, (1999), quienes también estudiaron la aplicación in vitro de distintos agentes antioscurecimiento como el ácido benzoico, EDTA, Glutathion, y 4-hexilresorcinol a una concentración 5mM, sobre la actividad de una PPO procedente de champiñones, y reportaron que el 4-hexilresorcinol fue el inhibidor que tuvo el mayor porcentaje de inhibición (97%), mientras que EDTA y ácido benzoico fueron los que generaron los porcentajes de inhibición más bajos. Dudley y Hotchkiss, (1988), reportaron que la cisteína a una concentración de 2 mM, inhibió en más del 90% la actividad de PPO de hongo, lo cual también coincide con nuestros resultados. No obstante, cuando este compuesto fue mezclado en cantidades equimoleculares con ácido ascórbico y/o ácido cítrico, no superaron la inhibición obtenida por el ácido ascórbico solo (70%) o la del ácido cítrico (20%), mientras que cuando fueron mezclados los tres juntos

la inhibición se incrementó desde el 70% hasta el 80% lo cual indicó cierto grado de sinergismo entre los compuestos mezclados, por lo que coincide con lo observado en nuestro estudio ya que utilizando mezclas equimoleculares de cisteína y ascórbico se mantuvo la inhibición casi completa de PPO.

Estos mismos autores corroboran que el mecanismo de acción de la cisteína para controlar el oscurecimiento es mediante la formación de un aducto incoloro Cys-quinona identificado como S-(2,3dihidroxi fenil) cisteína el cual es formado por la reacción del compuesto con la quinona de los fenoles. Si se tiene en cuenta que el ácido ascórbico reduce las quinonas a sus fenoles iniciales, nos muestra que ambos compuestos actúan sobre los fenoles; entonces es posible hallar una mayor inhibición del oscurecimiento si se mezclan compuestos que actúen en forma diferenciada unos sobre la enzima y otros sobre el sustrato o la quinona formada.

Los resultados de los ensayos in vitro demuestran la factibilidad de inhibir la actividad de ambas enzimas; sin embargo, el reto consiste en encontrar la forma de introducir estas soluciones al tejido sin causar alteraciones en su calidad visual. Ya que de lograrlo, se esperaría tener importantes porcentajes de inhibición enzimática y posiblemente reducción del oscurecimiento.

La inmersión de los frutos en una solución de ácido ascórbico 10 mM, solo logró inhibir el 20% de la actividad de ambas enzimas y ésta decreció durante el periodo de almacenamiento esto mostró la dificultad para lograr, dentro del tejido, la inhibición que se alcanzó in vitro. La causa de esta dificultad podría ser la piel del fruto que se transforma en barrera al paso de los compuestos por lo que se planteó la necesidad de infiltrar la solución a la misma concentración utilizando vacío. Los resultados encontrados mostraron también las limitaciones de este método ya que los porcentajes de inhibición, aunque variables nunca igualaron los resultados in vitro. Mercado-Silva (1999), hizo aplicaciones a través del agua de enfriamiento (4°C) de distintos ácidos (cítrico, málico y fosfórico) además de NaCl

al 1% con el objeto de reducir el oscurecimiento provocado por "el golpe de agua" en los duraznos procedentes de Michoacán, encontrando que todos los ácidos a la concentración ensayada, generaron lesiones en la piel de los frutos y que el tratamiento con NaCl al 1% podría controlar el problema aunque también indicó que el origen del mismo podría depender de otros factores como la nutrición de los árboles. Esto parece indicar que podría estudiarse la combinación de infiltración al vacío con la concentración y temperatura de aplicación para lograr una mayor inactivación de las enzimas involucradas.

La reactivación de enzimas en los distintos experimentos no están suficientemente estudiados aunque también fue observado por Sapers y Miller (1997), en el caso de particular de ácido ascórbico.

Los intentos para lograr el control del proceso de oscurecimiento se han desarrollado para productos de durazno procesado como los de Salvatori y *col.*, (1998) o el de Sumitani y *col.*, (1997) para productos deshidratados osmóticamente y pulpas homogeneizadas respectivamente o el de Vámos-Vigyázó, (1995), en el que estudió la inhibición de PPO en rebanadas de duraznos, sumergidas en ácido ascórbico, ácido cítrico, así como mezclas de sacarosa y ácido cítrico a distintas concentraciones y tiempos, logrando una inhibición de 100% con ácido cítrico al 3% durante 1 minuto o combinaciones de sacarosa-ácido cítrico durante 2 minutos, indicando que el efecto antioscurecimiento de estos compuestos es aditivo. No obstante lo interesante de estos resultados, su aplicación se limita a los productos procesados ya que en producto fresco las concentraciones utilizadas para el caso del ácido cítrico causaron daños en la piel como los asentó Mercado-Silva, (1999) o la imposibilidad de utilizar soluciones de azúcares en el fruto.

Luo y Barbosa-Cánovas (1995), tratando de formular un agente antioscurecimiento para manzana, sumergieron rebanadas en soluciones de 4 hexilresorcinol a concentraciones de 0 a 0.03%, o combinado con 0.5% de ácido ascórbico y/o

cloruro de calcio (0.2%), durante 10 minutos; evaluando los efectos durante 14 días de almacenamiento a 4.4°C. La combinación de 4-hexilresorcinol-ácido ascórbico, fue la que produjo el menor oscurecimiento. Sugiriendo como una posible explicación, que el 4 hexilresorcinol interactuó con PPO para evitar su participación en la reacción enzimática y que por su parte el ácido ascórbico redujo las quinonas formadas por la actividad residual de PPO.

Este experimento sugiere la aplicación de combinaciones de estos compuestos, ya que aparentemente se produce un efecto sinérgico. De acuerdo a nuestros datos, se esperaría que la aplicación de una mezcla de ascórbico-4 hexilresorcinol, contribuiría a inhibir ambas enzimas, ya que el 4 hexilresorcinol inhibió más a PPO (64.3%), mientras que el ácido ascórbico produjo los mayores porcentajes de inhibición de POD ($\cong 40\%$). La combinación de estos compuestos también ha sido utilizada en productos mínimamente procesados de peras, mangos, manzanas y duraznos. Buta y Abbott (2000), trataron tres variedades de peras ('Anjou', 'Bartlett' y 'Bosc') utilizando mezclas de 4 hexilresorcinol + ácido ascórbico (0.001 y 0.5 M respectivamente) más sorbato de potasio (0.05M) en las que sumergieron rebanadas de fruta, para posteriormente almacenarlas en aire durante 14 días a 5°C, observándose un menor oscurecimiento en los productos.

Sumitani y *col.*, (1997) reportaron que los purés de durazno sometidos a una presión hidrostática de 400 Mpa mantenida durante 10 minutos y adicionados de una mezcla de ácido ascórbico y/o cloruro de sodio (0.1 y 0.5% respectivamente), mostraron la mayor capacidad para inhibir el oscurecimiento. Pero que la aplicación de altas presiones a productos frescos no es recomendable ya que alteran su calidad visual.

Vamos-Vigyázó (1981), determinó la termotolerancia de PPO y POD en 22 cultivares de frutos de hueso pegado, encontrando que PPO fue la menos termoestable y POD una de las más termo resistentes, lo cual está de acuerdo a los resultados aquí mostrados.

El tratamiento térmico a 50°C, sólo logró la inhibición parcial de PPO, más no de POD, y aunque se ha reportado (Vamos-Vigyázó, 1981) que PPO es una enzima termo sensible y que cortas exposiciones de los tejidos a temperaturas de 70-90°C, es suficiente para la destrucción parcial o total de su función catalítica, estas condiciones son inaplicables a frutos intactos debido al daño superficial que se provoca aún a temperaturas de 50°C por periodos mayores de 6 minutos, como se demostró en este estudio.

Esto es una complicación adicional a este tratamiento considerando que para lograr una mayor inactivación se requiere de mejorar, la penetración de calor dentro del tejido lo cual está influido por el tamaño del fruto; es decir que frutos más grandes podrían necesitar mayores tiempos y seguramente se inducirían mayores daños.

En nuestros experimentos, al igual que en el tratamiento de infiltración, al incrementar el tiempo de permanencia en el agua de tratamiento (3,6 y 9 min.) se disminuyó la calidad visual de los frutos, debido al desarrollo de manchas oscuras en la piel.

Después de la aplicación de los tratamientos in vivo, se deduce que la solución al problema de oscurecimiento del durazno en fresco es muy compleja, ya que de los tratamientos aplicados, ninguno logró inhibir la actividad de PPO y POD más allá del 50%, después de tres días de almacenamiento; lo que muestra la necesidad de continuar los estudios buscando otras alternativas viables para la solución de este problema como la aplicación combinada de compuestos en conjunto con un adecuado manejo de la temperatura además de los esfuerzos por lograr variedades con mayor tolerancia al oscurecimiento.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ No existen valores de referencia para relacionar la actividad de PPO, contenido de fenoles y flavonoides que muestren la susceptibilidad al oscurecimiento de los materiales estudiados. No obstante, la actividad de polifenol oxidasa parece que es un factor clave del proceso.
- ❖ En forma general, los duraznos procedentes de la región de Michoacán muestran una mayor actividad de PPO, contenido de fenoles y de flavonoides y una mayor tendencia al oscurecimiento. Sin embargo, hubo variedades que no se ajustaron a este patrón.
- ❖ De forma contraria, los duraznos procedentes de las zonas de Aguascalientes y Querétaro, mostraron menores actividades de PPO, menor contenido de fenoles y flavonoides y menor tendencia al oscurecimiento; habiendo también materiales que no se ajustaron a esta descripción.
- ❖ De acuerdo al análisis de agrupamiento se formaron cuatro grupos de variedades que pueden servir de base para futuros trabajos de mejoramiento genético: Siendo el cuarto grupo con bajo contenido de fenoles y flavonoides y actividad de PPO baja, el más interesante para los trabajos de mejoramiento genético.
- ❖ La baja correlación de la actividad de PPO y potencial de oscurecimiento y la mejor correlación de éste con la actividad de POD, sugiere que la enzima peroxidasa puede estar involucrada en el proceso de oscurecimiento provocado por el daño mecánico.
- ❖ Es posible que la menor tendencia al oscurecimiento encontrada en la variedad 'Regio' también pueda estar asociada a la formación de productos de

condensación derivados de reacciones acopladas de oxidación entre el ácido clorogénico y la catequina.

- ❖ Los análisis de los compuestos fenólicos por HPLC permitieron identificar a el ácido clorogénico y la catequina como constituyentes de estos en los frutos estudiados; siendo el ácido clorogénico el más importante desde el punto de vista de concentración.
- ❖ En el caso de daño mecánico se considera que se lleva a cabo un proceso de lignificación en ambos cultivares ya que se tuvo mayor actividad de POD que PPO, con una tendencia al incremento en el contenido de fenoles totales y disminución en el contenido de flavonoides.
- ❖ No existió una correlación entre el oscurecimiento generado por el daño mecánico y la conductividad del tejido.
- ❖ El oscurecimiento generado durante el almacenamiento refrigerado fue menor que el observado durante el daño mecánico.
- ❖ Durante el almacenamiento refrigerado las actividades enzimáticas de PPO y POD, en ambas variedades, fueron mayores en los frutos transferidos de 5°C a 20°C.
- ❖ El mayor potencial de oscurecimiento de los frutos de la variedad 'Criollo tardío' sometidos a estrés de frío parece estar explicado por una mayor actividad de POD mientras que para el caso de la variedad 'Regio' este lo parece explicar mejor la actividad de PPO.
- ❖ Debe evaluarse la conveniencia de medir en forma sistemática la actividad de POD en los estudios de caracterización de variedades.

- ❖ La harinosidad la presentó en mayor proporción la variedad 'Criollo Tardío' que en 'Regio' lo cual demuestra que los materiales de cosecha tardía son más susceptibles a manifestar este desorden.
- ❖ Las variedades 'Criollo tardío' y 'Regio' pueden almacenarse a 5°C hasta por dos semanas con menor riesgo de presentar harinosidad.
- ❖ La aplicación de ácido ascórbico y cisteína como inhibidores de PPO y POD in vivo a concentraciones de 10 mM, no lograron inhibir la actividad de estas enzimas dentro de los tiempos de tratamiento estudiados.
- ❖ El 4 hexil resorcinol a concentraciones de 3 mM en infiltración al vacío fue el tratamiento que mostró mayor porcentaje de inhibición de PPO.
- ❖ El tratamiento térmico tuvo un efecto inhibitorio parcial de la actividad de PPO pero no tuvo ningún efecto sobre la actividad de POD.
- ❖ Los tratamientos de infiltración y térmico aplicados a los tiempos más altos provocaron daños superficiales a los frutos lo cual limitó la aplicación de los mismos para lograr mayor inhibición.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alba, M.C.,** Milrad de Forchetti, S., and Tigier, A.H. 1999. Characterization of a phenoloxidase and its distinction from peroxidases in peach endocarp. International Symposium for Plant Peroxidases-Peroxidase-'99, Columbus, Ohio, USA.
- Burnette, F.** 1977. Peroxidase and its relationships to food flavor and quality: a review. *J. Food Science.* 42:1-5.
- Buta, J.G.,** and Abbott, A.J. 2000. Browning Inhibition of Fresh-cut 'Anjou', 'Bartlett' and 'Bosc' Pears. *HortScience.* 35 (6): 1111-1113.
- Biggs, K.J.,**and Fry, S.C. 1987. Phenolic-Cross-Linking in the Cell Wall. Physiology of Cell Expansion During Plant Growth. The American Society of Plant Physiologists. Rockville. Maryland.
- Byrne, D.H.,** Nikolic, A.N. and Burns, E.E. 1991. Variability in sugar and acids, firmness and color characteristics of 12 peach genotypes. *J.Am.Soc.Hort.Sci.,* 116 : 1004.
- Cantwell, M.,** Orozco, W., and Rubatzky, V. 1992. Postharvest handling and storage of jicama roots. *Acta Horticulturae.* 318:333-343.
- Chen, J.S.** Balaban, M.O., Wei, Ch., Marshall, M.R., and Wei, Y.H. 1992. Inactivation of Polyphenoloxidase by High-Pressure Carbon Dioxide. *J. Agr. Food Chem.,* 40: 2345-2349.
- Cheng, G.** and Crisosto, C. 1995. Browning Potential, Phenolic Composition, and Polyphenoloxidase Activity of Buffer Extracts of Peach and Nectarine Skin Tissue. *J.Amer.Hort.Sci.* 120(5): 835-838.
- Cheyrier, V.,** Fulcrand, H., Guyot, S., Oszmianski, J. and Moutounet, M. 1995. Browning in Grape Musts and Wines. Enzymatic Browning and Its Prevention. ACS Symposium Series 600.
- Childs, R.E.** and Bardsley, W.G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethy-benzthiazolin-6-sulphonic acid) as chromogen. *J. Biochem.* 145: 93-103.

- Coseteng, M.Y., and Lee, C.Y.** 1987. Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning. *J.Food Science*. 52(4): 985-989.
- Crisosto, C., Cheng, G., Garner, D., Johnson, S., Mitchell, G., Luza, S., Kawai, K. and Beede, D.** 1991. Skin discoloration disorder (SD) of peach and nectarine fruit. California Tree Fruit Agreement. Annu.Rpt. Res. Projects.
- Crisosto, C., Cheng, G., Day, K., Garner, D., Hansen, H., Hose, E., Taylor, K., Boynton, C., and Beede, B.** 1992. Skin discoloration in peach and nectarine fruit. California Tree Fruit Agreement. Annu. Rpt. Res. Projects.
- Crisosto, C., Johnson, .R., Luza, J., and Day, K.** 1993. Incidence of Physical Damage on Peach and Nectarine Skin Discoloration Development: Anatomical Studies. *J.Amer.Hort.Sci.* 118(6): 796-800.
- Crisosto, C., Mitchell, G., and Ju, Z.** 1999. Susceptibility to Chilling Injury of Peach Nectarine, and Plum Cultivars Grown in California. *HortScience*. 34(6): 1116-1118.
- Dixon, A.R. and Paiva, L.N.** 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*. 7: 1085-1097.
- Dudley, D.E. and Hotchkiss, H.J.** 1989. Cysteine as an inhibitor of polyphenoloxidase. *J.Food.Biochem.* 13: 65-75.
- Feippe, M.; Vilas Boas, E.V.** 2001. Estudio de la Actividad Enzimática Post-Cosecha de Polifenoloxidasas and Peroxidasas en Durazno. *Rev.Iber.Tecnología Postcosecha*. 3(2): 179-184 .
- Fideghelli, C.** 1995. La producción de durazno en Italia y en los países de la costa del Mediterráneo. Pérez, S.G. Memorias de la primera Reunión Nacional e Internacional sobre producción de durazno, ciruelo y chabacano Qro.-Zac.p. 1-7.
- González-Rodríguez, Ma. de F.** 1998. Detección de Fuentes de Resistencia Genética a *Monilinia fructicola* (wint.) Honey y al Oscurecimiento Enzimático en Durazno. Universidad Autónoma de Querétaro. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República.

- Hanschke, E.P.** and Boynton, B. 1986. Heritability of Enzymatic Browning in Peaches. *HortScience*. 21(5): 1195-1197.
- Harel, E., Mayer, M.A., and Lerner, H .R.** 1970. Changes in the levels of catecholoxidase and laccase activity in developing peaches. *J.Sci.Fd.Agric.* 21:542-544.
- Hendriks, T.; Berg, B.M. and Schram, A.W.** 1985. Cellular location of peroxidase isoenzymes in leaf tissue of *Petunia* and their affinity for concavalin A-sepharose. *Planta*, 164: 89-95.
- Henry, E.W., De Poore, H.J. and O'Connor, M.N.** 1982. Sorbitol disrupted spinach (*Spinacia oleracea L.*) chloroplasts: cytochemical localization of polyphenol oxidase in discontinuous sucrose density gradient fractions. *Micron*, 13: 453-4.
- Hulme, A.C.** 1978. *Biochemistry of fruit and their products*, Vol.I, Academic Press, London.
- INEGI**, 1991. Cultivos Perennes de México. 75-79 pp.
- INEGI**, 1998. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos.
- Jaworski, W.A. and Lee, Y.Ch.** 1987. Fractionation and HPLC Determination of Grape Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 35: 257-259.
- Jen, J.J. and Kahler, R.K.** 1974. Characterization of PPO in peaches grown in the Southeast. *Hortscience*. 9: 590-591.
- Jiang, Y.** 2000. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *J of the Science and Food Agric*, 80: 305-310.
- Ju, Z., Duan, Y., and Ju, Z.** 2000. Leatheriness and mealiness of peaches in relation to fruit maturity and storage temperature. *J. Hort.Sci.Biotech.* 75(1): 86-91.
- Kader, A. A. and Chordas. A.** 1984. Evaluating the browning potential of peaches. *Calif. Agr.* (3 and 4): 14.
- Kato, C; Uritani., R. Saijo, and T. Takeo.** 1976. Cellular localization of particulate-bound polyphenol oxidase in tea leaves. *Plant Cell Physiol.*, 17: 1045-52.
- Kays, S. J.** 1990. Postharvest physiology of perishable plant products. An Avi Book.

- Khachik, F., G.R. Beecher, and W.R. Lubby.** 1989. Separation, identification and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grape fruit by liquid chromatography. *J. Agr. Food. Chem.* 37 : 1465.
- Lambrecht. H. S.** 1995. Sulfite Substitutes for the Prevention of Enzymatic Browning in Foods. Enzymatic Browning and Its Prevention. ACS Symposium Series 600..
- Larrigaudiere, C.; Lenthéric, I. and Vendrell, M.** 1998. Relationship Between Enzymatic Browning and Internal Disorders in Controlled-Atmosphere Stored Pears. *J.Sci.Food Agric.* 78: 232-236.
- Lee, Ch., Kagan, V., Jaworski, A., and Brown, S.** 1990. Enzymatic Browning in Relation to Phenolic Compounds and Polyphenoloxidase Activity among Various Peach Cultivars. 1990. *J. Agr. Food. Chem.* 38: 99-101.
- Lill, E.R., O'Donague M.E., and King, A.G.** 1989. Postharvest physiology of peaches and nectarines. *Hort.Rev.* 11:413-452.
- López, P.; Sala, F.J.; Fuente J.L. de la; Condón, S.; Raso,J.; and Burgos, J.** 1994. Inactivation of Peroxidase, Lipoxygenase, and Polyphenoloxidase by Manothermosonication. *J.Agric. Food Chem.* 42: 252-256.
- Luchsinger, L.E.** 1996. Quantification of peach maturity; chilling injury and changes in cell wall composition during storage, Ph.D. Diss. University of Maryland, College Park, USA. 135p.
- Luh, S.B., Hsu, E.T. and Stachowicz, K.** 1967. Polyphenolic compounds in canned cling peaches. *J.Food. Sci.* 32 : 251.
- Luh, S.B., and Phithakpol, B.** 1972. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *J.Food.Sci.* 37:264-268.
- Luo, Y., and Barbosa-Cánovas, G.** 1995. Inhibition of Apple-Slice Browning by 4-hexylresorcinol. Enzymatic Browning and its prevention. ACS Symposium Series 600. Chapter 19.
- Luza, G.J., Van Gorsel, R., Polito, V.S., and Kader, A.A.** 1992. Chilling Injury in Peaches: A Cytochemical and Ultrastructural Cell Wall Study. *J.Amer.Soc.Hort. Sci.* 117(1): 114-118.

- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. and Billiot, J.** 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Marqués, L.; Fleuriet, A. and Macheix, J.** 1995. Fruit Polyphenol Oxidases. Enzymatic Browning and Its Prevention. ACS Symposium Series.
- Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Burló, F., Carbonell, A., Burgos, L., and Riquelme, F.** 2000. Exogenous Polyamines and Giberellic Acid Effects on Peach (*Prunus Persica (L.) Batsch*) Storability Improvement. *J. Food Science*. 65(2): 288-294.
- Mercado-Silva, E.** 1999. Desarrollo de Tecnología para el Manejo Poscosecha de Durazno en el Estado de Michoacán, Fundación PRODUCE del Estado de Michoacán. Informe Técnico.
- Meyer, H.U. and Biehl, B.** 1980. Relation between photosynthetic and phenolase activities in spinach chloroplasts. *Phytochemistry*, 21: 9-12.
- Miller, A.R. Dalmasso, J.P., and Kretchman, D.W.** Developmental Variation of Cell Wall Degrading Enzymes from Cucumber (*Cucumis Sativus*) Fruit Tissues. *Can.J.Bot.*, 67:817-821.
- Mitchell, F.G., and Kader, A.A.** 1989. Factors affecting deterioration rate. Peaches, plums and nectarines. Growing and Handling for fresh market. Cooperative extension. University of California. In: J.H.LaRue and R.S.Johnson (eds).
- Möller, B. and Herrmann, K.** 1983. Quinic Acids Esters of Hidroxcinnamic Acids in Stones and Pome Fruit. *Phytochemistry*. 22:477-481.
- Montgomery, M.W. and Sgarbieri, V.C.** 1975. Isoenzymes of banana polyphenoloxidase. *Pytochemistry*. 14: 1245.
- Moore, J. and Ballington, J.** 1991. Genetic Resources of temperate fruit and nut crops 1. International Society for Horticultural Science.
- Mourguchi, T., T, Sanada, and S. Yamaki.** 1990. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit, *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 115: 278.
- Murake, S.** 1988. The current position and problems in the cultivation of dwarf peach trees-Cultivation using dwarfing rootstocks research. *J. Food Agriculture*, 11 (4): 17.

- Murata, T.** 1990. Relation of Chilling Stress to Membrane Permeability. *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC. Press. Boca Raton. Fl.
- Nicolas, J.J.** Richard-Forget, F., Goupy, P, Amiot, M.J., and Aubert, S. 1994. Enzymatic browning in apple and apple products. *C.R.C., Crit.Rev.Food Sci.Nut.* 34(2): 109-157.
- Ose, K.,** Chachin, K., and Imahori, Y. 1995. Browning mechanism of Water Convolvulus (*Ipomoea aquatica* Fosk.) stored at low temperature. Enzymatic Browning and Its Prevention. ACS Symposium Series 600.
- Palmieri, S.,** Odoardi, M., Soressi,G.P., and Salamini, F. 1978. Indolacetic Acid Oxidase Activity in Two High-Peroxidase Tomato Mutants. *Plant Physiol.*, 51:577-583
- Raison, K.J.,** and Orr, R.G. 1990. Proposal for a Better Understanding of the Molecular Basis of Chilling Injury. *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC. Press. Boca Raton. Fl.
- Radi, M.,** Mahrouz, M., Jaouad, A., Tacchini, M., Aubert, S., Hugues, M., and Amiot, J. 1997. Phenolic Composition, Browning Susceptibility, and Carotenoid Content of Several Apricot Cultivars at Maturity. *HortScience*. 32(6): 1087:1091.
- Richard-Forget, F.,** Amiot, J.M., Goupy, P., and Nicolas, J. 1995. Evolution of Clorogenic Acid-o-Quinonas in Model Solutions. Enzymatic Browning and Its Prevention. ACS Symposium Series 600.
- Richard-Forget, F.,** and Gaulliard, F. 1997. Oxidation of Clorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenoloxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. *J.Agric. Food. Chem.* 45: 2472-2476.
- Robb, D. A.** 1984. Tyrosinase. *In Copper Proteins and Copper Enzymes*, ed.R.Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 207-241.
- Robinson, D.S.** and Eskin, N.A. 1991. Peroxidases and catalases in foods. *Oxidative Enzymes in foods*, Ed. Elsevier Applied Science.

- Ros Barcelo, A., Muñóz, R. and Sabater, F.** 1987. Lupin peroxidases.I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Planta.*, 71: 448-54.
- Salunkhe, D.S. and Kadam, S.S.** 1995. Peaches and Nectarines. Handbook of fruit science and technology; *production, composition, storage, and procesing*, Marcel Deker, Inc.
- Salvatori, D., Andrés, A., Chiralt, A., Fito, P.** 1998. The response of some properties of fruits to vacuum impregnation. *J .Food Process Engineering*. 21: 59-73.
- Sapers, M.G. and Miller, L.R.** 1997. Effective Browning Inhibitor Treatments for Fresh-cut Pears. Presented at 1997. Institute of Food Technologists Annual Meeting.
- Schreier, B. and Miller, E.** 1985. Studies on flavonol degradation by peroxidase (Donor: H₂O₂ – oxidoreductase, E.C 1.1.1.7): Part 2-Quercetin. *Food Chem*, 18: 301-17.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimeter of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstanic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Strack, D.** 1997. Phenolic Metabolism. *Plant Biochemistry*. Academic Press Ltd.
- Sumitani, H., Suekane, S., Nakatani, A., and Tatsuka, K.** 1997. The Effect of Added L-Ascorbic Acid, and Sodium Chloride on the Change in Concentration of Some Volatiles in Pressurised Homogenate during Storage. *J.Sci.Food.Agric.* 75: 73-79.
- Tolbert, N.E.** 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloplast. *Plant Physiol.*, 51, 234-44.
- Van Gorsel, H., Li, C., Kerbel, L.E., Smits, M., and Kader, A.A.** 1992. Compositional Characterization of Prune Juice. *J.Agric.Food.Chem.* 40: 784-789.
- Vámos-Vigyázó, L.** 1981. Polyphenoloxidase and Peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 15: 49-127.
- Vámos-Vigyázó, L.** 1995. Prevention of Enzymatic Browning. *Enzymatic Browning and Its Prevention*. ACS Symposium Series 600.

- Vergano, P.J., Testin, R.F., Newall, J.W. and Trezza T.** 1995. Damage loss cost for peach impacts bruising. *J. Food Quality.* 18: 265-278.
- Walker, R.L J.** 1995. Enzymatic Browning in Fruits. *Enzymatic Browning and Its Prevention.* ACS Symposium Series 600.
- Weemaes, A.C., Ludikhuyze, R.L., Van den Broeck, I., and Hendrickx, E.M.** 1999. Influence of pH, Benzoic Acid, Glutathione, EDTA, 4-Hexylresorcinol, and Sodium Chloride on the Pressure Inactivation Kinetics of Mushroom Polyphenoloxidase. *J.Agric.Chem.* 47: 3526-3530.
- Whitaker, J., and Lee, Ch.** 1995. Enzymatic Browning in Fruits. *Enzymatic Browning and Its Prevention.* ACS Symposium Series 600.
- Williams, D., Lim, M.H., Chen, O.A., Pangborn, R.M. and Whitaker, J.R.** 1985. Blanching of vegetables for freezing. Which indicator to choose? *Food Technol.* 40: 130-140.
- Zhishen, J., Mengsheng, T.Y., and Jianming, W.** 1998. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry.* 64: 555-559.

APÉNDICE

A. Curva estándar para fenoles totales

◆ Curva de calibración:

Una solución de ácido cumárico (0.1 mg/ml) se diluyó a 0.025 mg/ml, para lo cual se tomaron 12.5 ml y se aforó a 50 ml con agua destilada; a partir de ésta se prepararon los estándares. Para la preparación de estándares se tomaron por duplicado matraces volumétricos de 25 ml y se agregaron 5 ml de agua a cada uno, posteriormente se adicionaron 0,1,2,3,4 y 5 ml de la solución estándar de ácido cumárico 0.025 mg/ml, se adicionó a cada matraz 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se esperó de 5 a 8 minutos. Se adicionaron 10 ml de NaCO₃ (7%) a cada matraz. Se mezcló y aforó, se almacenó a temperatura ambiente durante 1 hora y se leyó la absorbancia a 750 nm. El ensayo se realizó por duplicado. Los datos obtenidos para esta curva de calibración se muestran a continuación:

| Vol. Stock de ác. cumárico (0.025mg/ml) | Concentración (mg/ml) | Absorbancia (nm) |
|--|--------------------------|---------------------|
| 0 | 0.000 | 0.0067 |
| 1 | 0.025 | 0.1360 |
| 2 | 0.050 | 0.2070 |
| 3 | 0.075 | 0.3490 |
| 4 | 0.100 | 0.4290 |
| 5 | 0.125 | 0.5240 |

B. Curva estándar para flavonoides totales

♦ Curva estándar:

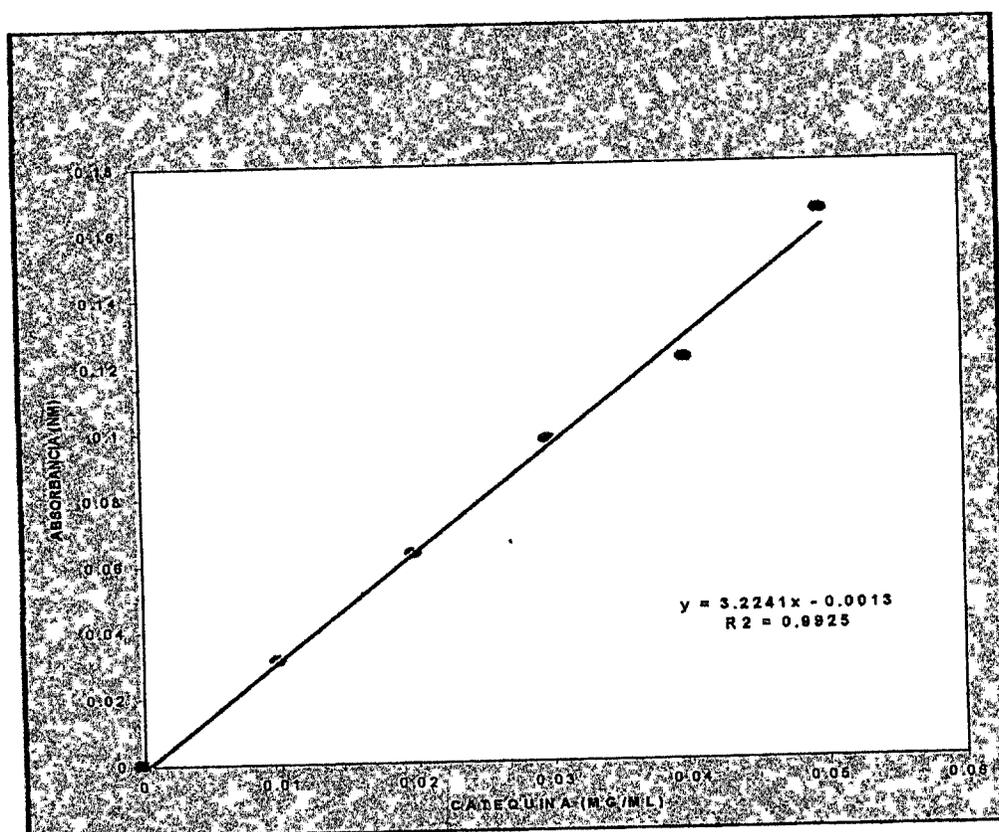
Se preparó una solución de catequina 0.5 mg/ml la cual se diluyó a una concentración de 0.05 mg/ml y a partir de ésta se realizó la curva estándar, los ensayos se hicieron por duplicado. En matraces aforados de 10 ml se colocaron 4 ml de agua destilada y 0,0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 ml de la solución stock, posteriormente se adicionaron 0.3 ml de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%, y después de 5 minutos se añadieron 0.3 ml de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10%, 6 minutos más tarde se adicionaron 2 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1M, se aforó con agua destilada y se mezcló, la absorbancia de la mezcla de reacción se leyó a 510 nm. En el Apéndice B se puede observar la curva obtenida en alguno de los ensayos realizados. Los datos de la curva de calibración fueron los siguientes:

| Vol. Stock de catequina (0.05 mg/ml) | Concentración (mg/ml) | Absorbancia (nm) |
|---|--------------------------|---------------------|
| 0.0 | 0.00 | 0 |
| 0.2 | 0.01 | 0.0310 |
| 0.4 | 0.02 | 0.0630 |
| 0.6 | 0.03 | 0.0970 |
| 0.8 | 0.04 | 0.1210 |
| 1.0 | 0.05 | 0.1650 |

Con una regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación que se utilizó para la cuantificación de cada muestra:

$$Y = 3.2241X - 0.0013$$

$$R^2 = 0.9925$$



Con estos datos se realizó una regresión lineal cuya ecuación de ajuste fue:

$$Y = 4.0298X + 0.0257$$

El coeficiente de correlación de esta ecuación fue:

$$R^2 = 0.9953$$

