



**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)**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE OSCURECIMIENTO  
EN JÍCAMA MÍNIMAMENTE PROCESADA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ELIA NORA AQUINO BOLAÑOS**

**DIRIGIDO POR**

**DR. EDMUNDO MERCADO SILVA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE DEL 2002**

No. Adq. H 67936

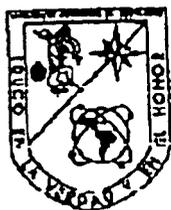
No. Título \_\_\_\_\_

Clas 664.81

A 657e

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
 FACULTAD DE QUÍMICA  
 DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS  
 PROPAC

ESTUDIO DEL MECANISMO DE OSCURECIMIENTO EN JÍCAMA  
 MÍNIMAMENTE PROCESADA

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
 DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:  
 M. EN C. ELIA NORA AQUINO BOLAÑOS

DIRIGIDO POR:  
 DR. EDMUNDO MERCADO SILVA

SINODALES:

DR. EDMUNDO MERCADO SILVA  
 PRESIDENTE

  
 FIRMA

DR. CHIANG Y. LEE  
 SECRETARIO

\_\_\_\_\_  
 FIRMA

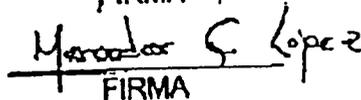
DRA. MARITA CANTWELL  
 VOCAL

  
 FIRMA

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH  
 VOCAL

  
 FIRMA

DRA. MERCEDES G. LÓPEZ  
 VOCAL

  
 FIRMA

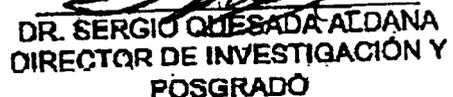
DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ  
 SUPLENTE

\_\_\_\_\_  
 FIRMA

DRA. LIDIA DORANTES DE PARADA  
 SUPLENTE

\_\_\_\_\_  
 FIRMA

M. EN C. GUSTAVO PEDRAZA ABORTES  
 DIRECTOR DE LA FACULTAD

  
 DR. SERGIO QUESADA ALDANA  
 DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y  
 POSGRADO

CENTRO UNIVERSITARIO  
 QUÉRETARO, QRO., MÉXICO. OCTUBRE 2002

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. Edmundo Mercado Silva, contando con el apoyo económico del Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Querétaro y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto “Estudio de los mecanismos de oscurecimiento en productos de frutas y hortalizas”, clave 31684-B.

## **DEDICATORIAS**

*A Dios, gracias por estar conmigo en cada instante de mi vida, por que sólo tú sabes lo fácil o difícil que fue llegar a este momento.*

*A mis queridos padres Artura y Antonio por darme la confianza y libertad para buscar y lograr mis propios sueños.*

*A mis queridas hermanas Luisa e Hilda por las palabras de aliento y el cariño sincero que siempre me han demostrado. Son ustedes mis mejores amigas.*

*A mis hermanos Edwin, René y Roberto por compartir conmigo mis pequeños triunfos y tropiezos.*

*A la familia Corona Velázquez, especialmente a mi suegra Ma. Eugenia por ser un ejemplo de superación y entereza aún en las situaciones más difíciles.*

*A mis amigos Erika Fuentes y Javier Rivera por escucharme y alentarme a continuar siempre adelante.*

*A mis amigos Godofredo, Luis y Judith por los momentos que compartimos y que nos mantiene unidos a pesar del tiempo y la distancia.*

*De manera especial:*

*A tí Rubén por el apoyo incondicional que me has brindado, por hacer tuyos mis sueños aún cuando eso signifique grandes sacrificios y por que tu amor es la razón de mi vida. Te amo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Edmundo Mercado Silva por la confianza que depositó en mí para ser parte en la realización de este proyecto de investigación, el cual me permitió crecer como persona y nacer como investigador. También quiero agradecerle el apoyo y la amistad que me ha brindado. Por siempre..... Gracias.*

*A mis sinodales: Dra. Mercedes López, Dra. Lidia Dorantes, Dra. Marita Cantwell, Dr. Mamadou Moustapha y Dr. Marcos Soto por sus aportaciones a esta investigación y por el tiempo dedicado a la revisión del documento.*

*Al Q.F.B. Octavio Arrellín por su valiosa ayuda en el manejo del equipo de HPLC.*

*Al Dr. Chang Y. Lee por las facilidades que me brindó en su laboratorio durante mi estancia en la Estación Experimental de Agricultura de la Universidad de Cornell.*

*A Nancy Smith por su apoyo técnico durante mi estancia en la Universidad de Cornell.*

*A los estudiantes Edmundo Mercado, Judith, Alejandra, Claudia y Luz Elena por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.*

*A Nancy, Marilú y Jesica por ayudarnos a conocer un poco más acerca del mecanismo de oscurecimiento en jícama.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Zoraida Lagunas, Rocío Meraz y Estela Vázquez por los agradables momentos de trabajo y convivencia.*

*A los profesores del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por compartir sus conocimientos con nosotros.*

*A las secretarias Carmelita, Laura y Silvia por su apoyo administrativo.*

*Al M en C Javier Pérez Flores del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por su colaboración para la realización de los análisis de espectrometría de masas.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico para la realización de mis estudios de doctorado.*

## RESUMEN

El fenómeno de oscurecimiento enzimático en frutas y hortalizas frescas o mínimamente procesadas es responsable de la pérdida de calidad y económica de muchos de estos productos. Las explicaciones actuales a este fenómeno indican que éste se debe a la oxidación catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) sobre los compuestos fenólicos, transformándolos en quinonas, que se polimerizan o reaccionan con grupos amino formando compuestos coloridos. No obstante, en muchos productos la actividad de PPO y el contenido de fenoles no explican satisfactoriamente el grado de oscurecimiento mostrado por esos productos. Por lo ello, es importante estudiar y proponer mecanismos alternos que expliquen el proceso de oscurecimiento. El objetivo de este trabajo fue definir el mecanismo que genera el oscurecimiento en la superficie cortada de jícama mínimamente procesada. Cilindros de jícama (1.8 x 5 cm) fueron almacenados a 10 y 20°C. Diariamente, se midieron los cambios en el color, las actividades de PPO y peroxidasa (POD) y el contenido de fenoles totales. Los fenoles fueron separados por HPLC y cada fracción se analizó como sustrato de PPO. También se midió el contenido de ligninas totales y sus monolignoles fueron oxidados y analizados por HPLC y espectrometría de masas. Después de ocho días de almacenamiento, el contenido de fenoles totales fue mayor en el tejido expuesto al daño (1.04 mg ác. gálico g<sup>-1</sup>); en tanto que la actividad de PPO, utilizando catecol como sustrato (no presente en la jícama), alcanzó valores de 5 unidades de actividad g<sup>-1</sup> después de 6 días de almacenamiento. No obstante, los fenoles separados por HPLC no fueron buenos sustratos para PPO. Después de seis días de almacenamiento, el contenido de ligninas se incrementó de 16.6 a 52.2 mg de ác. cumárico g<sup>-1</sup> materia seca al igual que la actividad de POD (de 74.35 a 448.32 UA/g tejido fresco). En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los ácidos caféico y ferúlico, el siringaldehído y el alcohol coniferílico (compuestos intermediarios en la biosíntesis de ligninas) fueron buenos sustratos para POD con Km de 89.4, 150.0, 44.1 y 580 µM. La aplicación, *in vivo*, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, precursores de la biosíntesis de ligninas y de monolignoles produjeron un rápido oscurecimiento del tejido. Los análisis por espectrometría de masas indicaron la presencia de las unidades estructurales de las ligninas en el tejido oscuro. Estos resultados indicaron que el proceso de lignificación es el mecanismo que explica el oscurecimiento en las piezas de jícama (a 10 y 20°C), en el cual la enzima POD tiene un papel importante mientras que PPO tiene un papel secundario en este proceso.

Palabras clave: jícama, oscurecimiento enzimático, polifenol oxidasa, peroxidasa, ligninas, daño mecánico, productos mínimamente procesados.

## SUMMARY

The enzymatic browning in fresh fruits and vegetables or fresh-cut products is responsible of quality and economic losses of many products. The current explanations of this phenomenon indicate that this is due to oxidation of phenolic compounds catalyzed by polyphenol oxidase (PPO) enzyme, transforming them to quinones and then polymers or melanins (brown pigments). Nevertheless, in many products the PPO activity or the phenolic content do not fully explain the degree of discoloration developed by those products. It is important to study and to propose alternative mechanisms to explain the browning process. The objective of this work was to define the mechanism that results in browning in fresh-cut jicama. Jicama cylinders (1.8 x 5 cm) were stored at 10 and 20°C. Color changes, PPO and peroxidase (POD) activities and total phenolics content were measured daily. The phenolic compounds were separated by HPLC and each fraction was analyzed as a PPO substrate. The total lignin content was measured and the monolignols were oxidized and analyzed by HPLC and mass spectrometry. At eight days, the total phenolic content was higher in the wounded tissue (1.04 mg gallic acid/ g fresh tissue). Using catechol as substrate (this compound is not found in jicama tissue). PPO activity reached values as high as 5 AU (activity units)/g after 6 days. Nevertheless, the phenolic compounds separated by HPLC were not good substrates for PPO. After six days, the lignin content increased from 16.6 to 52.2 mg coumaric acid/g dry matter, and in a similar way POD activity increased (from 74.35 to 448.32 UA/g fresh tissue). In the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, caffeic and ferulic acids, syringaldehyde and coniferyl alcohol (intermediates in lignin biosynthesis) were good substrates for POD with Km concentrations of 89.4, 150.0, 44.1 and 580 μM, respectively. Application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lignin precursors and monolignols to wounded tissue, resulted in more rapid browning than in control tissue. The mass spectrometry analyses indicated the presence of the structural units of lignin in the discolored tissue. These results indicated that browning of fresh-cut jicama (at 10 and 20°C) was correlated with the lignification process, in which the enzyme POD has an important role while PPO activity has a less important role.

Key words: jicama, enzymatic browning, polyphenol oxidase, peroxidase, lignin, mechanical wounding, fresh-cut products.

# ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMEN  | i      |
| SUMMARY  | ii     |
| ÍNDICE   | iii    |
| ÍNDICE DE FIGURAS  | viii   |
| ÍNDICE DE CUADROS  | xi     |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 1      |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA  | 4      |
| 2.1. Importancia de la jícama  | 4      |
| 2.2. Productos mínimamente procesados                                  | 6      |
| 2.2.1. Calidad de los productos mínimamente procesados                 | 6      |
| 2.2.2. Efectos físicos y fisiológicos importantes del procesado mínimo | 6      |
| 2.2.2.1. Efectos físicos del daño mecánico                             | 7      |
| 2.2.2.2. Efectos fisiológicos del daño mecánico                        | 7      |
| 2.3. Oscurecimiento enzimático: variables involucradas                 | 11     |
| 2.3.1. Compuestos fenólicos  | 11     |
| 2.3.1.1. Importancia biológica   | 12     |
| 2.3.1.2. Biosíntesis de fenoles en respuesta al daño mecánico          | 12     |
| 2.3.2. Polifenol oxidasa (PPO)   | 15     |
| 2.3.2.1. Localización de PPO en las plantas.                           | 17     |
| 2.3.2.2. Especificidad del sustrato                                    | 17     |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.2.3. Correlación entre compuestos fenólicos, actividad de PPO y oscurecimiento | 18 |
| 2.4. Proceso de lignificación.   | 20 |
| 2.4.1. Biosíntesis de los monolignoles   | 21 |
| 2.4.2. Transporte de monolignoles a la pared celular                               | 23 |
| 2.4.3. Importancia de la enzima peroxidasa (POD) en la biosíntesis de ligninas     | 24 |
| 2.4.3.1. Localización de POD en las plantas  | 25 |
| 2.4.3.2. Mecanismo de reacción de POD  | 25 |
| 2.4.3.3. Acoplamiento de monolignoles catalizado por peroxidasa                    | 27 |
| 2.4.4. Formación de las macromoléculas de ligninas                                 | 28 |
| 3. JUSTIFICACIÓN   | 33 |
| 4. HIPÓTESIS   | 34 |
| 5. OBJETIVOS   | 34 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS  | 36 |
| 6.1. Estrategia experimental   | 36 |
| 6.1.1. Material biológico  | 36 |
| 6.1.2. Manejo de las raíces  | 36 |
| 6.1.3. Preparación de la jícama mínimamente procesada                              | 39 |
| 6.1.4. Almacenamiento de los cilindros de jícama                                   | 39 |
| 6.2. Métodos empleados   | 40 |
| 6.2.1. Determinación de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO)          | 40 |
| 6.2.1.1. Extracción de la enzima   | 40 |
| 6.2.1.2. Ensayo de actividad   | 40 |
| 6.2.1.3. Determinación de la temperatura óptima                                    | 41 |
| 6.2.1.4. Determinación de pH óptimo  | 41 |
| 6.2.1.5. Determinación de $K_m$ y $V_{máx}$  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 6.2.2. Determinación de la actividad de peroxidasa (POD)   | 42 |
| 6.2.2.1. Extracción de la enzima   | 42 |
| 6.2.2.2. Ensayo de la actividad de POD durante el almacenamiento<br>del tejido   | 42 |
| 6.2.2.3. Determinación de temperatura óptima   | 42 |
| 6.2.2.4. Determinación de pH óptimo  | 43 |
| 6.2.2.5. Determinación de Km y Vmáx  | 43 |
| 6.2.2.6. Contenido de proteína   | 43 |
| 6.2.2.7. Ensayo de la actividad de POD utilizando fenoles intermediarios<br>en la biosíntesis de ligninas                                      | 44 |
| 6.2.3. Análisis del contenido de fenoles totales   | 44 |
| 6.2.3.1. Obtención del extracto  | 44 |
| 6.2.3.2. Cuantificación  | 45 |
| 6.2.4. Medición de color   | 45 |
| 6.2.5. Separación e identificación de compuestos fenólicos solubles en<br>etanol por HPLC  | 46 |
| 6.2.5.1. Obtención del extracto  | 46 |
| 6.2.5.2. Purificación del extracto   | 46 |
| 6.2.5.3. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC   | 47 |
| 6.2.5.4. Separación de compuestos fenólicos por HPLC utilizando una<br>columna preparativa   | 47 |
| 6.2.5.5. Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos   | 48 |
| 6.2.5.6. Hidrólisis ácida del extracto etanólico   | 49 |
| 6.2.6. Pruebas histoquímicas para determinar la presencia de ligninas<br>y suberinas   | 49 |
| 6.2.7. Pruebas histoquímicas para evaluar la participación de algunos fenoles<br>y las enzimas (PPO y POD) en el desarrollo del oscurecimiento | 49 |
| 6.2.8. Análisis de los compuestos fenólicos presentes en la fracción<br>insoluble en etanol  | 50 |
| 6.2.8.1. Preparación de la muestra   | 50 |
| 6.2.8.2. Cuantificación del contenido total de ligninas  | 50 |

|  |    |
|--|----|
| 6.2.8.3. Separación e identificación de algunos compuestos fenólicos ligeramente unidos a la pared celular | 51 |
| 6.2.8.4. Análisis de los monolignoles presentes en las ligninas  | 52 |
| 6.2.8.4.1. Identificación de los monolignoles  | 53 |
| 6.2.8.4.2. Purificación de los monolignoles  | 53 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN  | 55 |
| 7.1. Evidencias del problema de oscurecimiento en jícama mínimamente procesada                             | 55 |
| 7.2. Cambios de color en tejido almacenado a 20°C  | 57 |
| 7.3. Estudios diferenciales de tejido interno y externo  | 59 |
| 7.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos de PPO  | 59 |
| 7.3.1.1. Temperatura óptima  | 59 |
| 7.3.1.2. pH óptimo   | 61 |
| 7.3.1.3. Determinación de Km y Vmáx  | 61 |
| 7.3.2. Actividad de PPO durante el almacenamiento de los cilindros   | 62 |
| 7.3.3. Contenido de fenoles totales  | 63 |
| 7.4. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC   | 64 |
| 7.4.1. Identificación de los compuestos fenólicos  | 68 |
| 7.4.2. Actividad de PPO frente a los compuestos fenólicos separados por HPLC                               | 69 |
| 7.4.3. Hidrólisis ácida del extracto etanólico   | 73 |
| 7.5. Papel de la enzima peroxidasa (POD) en el oscurecimiento de las piezas de jícama                      | 76 |
| 7.5.1. Determinación de los parámetros cinéticos de POD  | 76 |
| 7.5.1.1. Temperatura óptima  | 76 |
| 7.5.1.2. pH óptimo   | 78 |
| 7.5.1.3. Determinación de Km y Vmáx  | 78 |
| 7.5.2. Determinación de POD durante el almacenamiento  | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| 7.6. Ensayos histoquímicos para la determinación de ligninas y suberinas   | 82  |
| 7.7. Actividad de peroxidasa (POD) utilizando como sustratos fenoles intermediarios en la biosíntesis de ligninas  | 83  |
| 7.8. Actividad de POD utilizando como sustratos los compuestos fenólicos solubles en etanol obtenidos a partir del tejido de jícama                        | 86  |
| 7.9. Cambios en el contenido de lignina durante el oscurecimiento de los cilindros de jícama   | 88  |
| 7.10. Ensayos <i>in vivo</i> de la participación de PPO, POD y los compuestos intermediarios de la síntesis de lignina en el desarrollo del oscurecimiento | 90  |
| 7.11. Determinación de algunos compuestos fenólicos presentes en el residuo insoluble  | 91  |
| 7.12. Caracterización del tipo de ligninas   | 94  |
| 7.13. Análisis por espectrometría de masas de las unidades estructurales de las ligninas   | 101 |
| 7.14. Mecanismo propuesto para la formación del oscurecimiento en piezas de jícama   | 102 |
| 8. CONCLUSIONES  | 111 |
| 9. LITERATURA CITADA   | 112 |
| 10. APÉNDICE   | 121 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |  | Página |
|--------|--|--------|
| 2.1.   | Reacciones catalizadas por PPO.  | 16     |
| 2.2.   | Biosíntesis de monolignoles.   | 22     |
| 2.3.   | Formación del radical fenoxílico catalizado por peroxidasa.  | 27     |
| 2.4.   | Formación de dímeros de monolignoles.  | 29     |
| 2.5.   | Representación esquemática de la formación de ligninas de acuerdo al modelo aleatorio.   | 31     |
| 2.6.   | Representación esquemática de la formación de ligninas de acuerdo al modelo de la proteína dirigente.  | 32     |
| 6.1.   | Metodología (Etapa 1).   | 37     |
| 6.2.   | Metodología (Etapa 2).   | 38     |
| 7.1.   | Oscurecimiento en cilindros de jícama almacenados a 5 y 13°C, durante 8 días.  | 55     |
| 7.2.   | Contenido de fenoles totales (A), actividad de las enzimas PAL (B), color (C) y actividad de la enzima PPO (D) en discos de jícama del Bajío almacenados durante 9 días. | 56     |
| 7.3.   | Parámetros de color en cilindros de jícama almacenados a 20°C.   | 58     |
| 7.4.   | Efecto de la temperatura (A), pH (B) y concentración de catecol (C) sobre la actividad de la enzima PPO.   | 60     |
| 7.5.   | Cambios en la actividad de la enzima PPO en el tejido interno y externo de cilindros de jícama almacenados a 10 y 20°C.  | 62     |
| 7.6.   | Variación del contenido total de fenoles en el tejido interno y externo de cilindros de jícama almacenados a 10 y 20°C.  | 64     |
| 7.7.   | Cromatogramas de compuestos fenólicos solubles en etanol, extraídos del tejido externo de cilindros de jícama almacenados 0, 2 y 4 días a 20°C.                          | 65     |
| 7.8.   | Fracciones de compuestos fenólicos colectadas (A) y utilizadas como sustrato para PPO (B).   | 70     |
| 7.9.   | Cromatogramas de compuestos fenólicos sin hidrolizar (A) e hidrolizados (B).   | 74     |
| 7.10.  | Efecto de la temperatura (A), pH (B), concentración de ABTS (C) y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (D) sobre la actividad de la enzima peroxidasa.                          | 77     |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 7.11. | Cambios en la actividad de POD (A), contenido de proteína (B) y actividad específica de POD (C) durante el almacenamiento de cilindros 10 y 20°C.            | 80  |
| 7.12. | Prueba histoquímica con fluoroglucinol para detectar la presencia de ligninas (A) y sudan IV para suberinas (B).   | 83  |
| 7.13. | Efecto de la concentración del ác. cumárico (A), ác. caféico (B), ác. ferúlico (C), coniferaldehído(D) y alcohol coniferílico (E) sobre la actividad de POD. | 85  |
| 7.14. | Fracciones de compuestos fenólicos colectadas y utilizadas como sustrato para POD.   | 87  |
| 7.15. | Cambios en el contenido de ligninas (A) y cromaticidad (B) en la parte externa de cilindros de jícama almacenados durante 6 días.                            | 89  |
| 7.16. | Prueba histoquímica en amortiguador conteniendo catecol o peróxido de hidrógeno.   | 90  |
| 7.17. | Prueba histoquímica en amortiguador conteniendo ác. cumárico o ác. ferúlico y peróxido de hidrógeno.   | 91  |
| 7.18. | Concentración de los fenoles generados durante la oxidación con nitrobenceno.  | 95  |
| 7.19. | Cromatograma de compuestos fenólicos producidos durante la oxidación del residuo insoluble en etanol con nitrobenceno.                                       | 96  |
| 7.20  | Cambios en el contenido de 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído durante el almacenamiento de cilindros de jícama.                              | 98  |
| 7.21  | Espectro de masas del estándar puro de siringaldehído.   | 104 |
| 7.22  | Espectro de masas del estándar puro de vainillina.   | 105 |
| 7.23  | Espectro de masas del estándar puro de 4-hidroxibenzaldehído.  | 106 |
| 7.24  | Espectro de masas del compuesto previamente identificado como siringaldehído.  | 107 |
| 7.25  | Espectro de masas del compuesto previamente identificado como vainillina,  | 108 |
| 7.26  | Espectro de masas del compuesto previamente identificado como 4-hidroxibenzaldehído.   | 109 |
| 7.27  | Mecanismo propuesto para explicar la formación de ligninas a partir del alcohol coniferílico   | 110 |
| A1    | Curva de calibración para calcular el contenido de proteína utilizando el método de Bradford (1976).   | 122 |
| A2    | Curva de calibración para calcular la concentración de fenoles totales utilizando el método de Sigleton y Rossi (1965).                                      | 123 |

A3

Curva de calibración para calcular el contenido total de ligninas por el método de Ketsa y atantee (1998).

124

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |  | Página |
|--------|--|--------|
| 2.1.   | Principales estados productores de jícama.   | 4      |
| 2.2.   | Comparación de la composición nutricional de la jícama con otras raíces (en 100 g de materia húmeda).  | 5      |
| 7.1.   | Contenido relativo de compuestos fenólicos calculados como mg de vainillina/g de tejido fresco.  | 67     |
| 7.2.   | Actividad de PPO utilizando como sustrato las fracciones de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico.                               | 71     |
| 7.3.   | Compuestos obtenidos como producto de la hidrólisis ácida del extracto etanólico (calculados como $\mu\text{g}$ de vainillina/g de tejido fresco). | 73     |
| 7.4.   | Constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidades máximas ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para POD utilizando diferentes fenoles.                       | 86     |
| 7.5.   | Contenido de compuestos fenólicos obtenidos del residuo insoluble en etanol (hidrólisis alcalina).   | 93     |
| 7.6.   | Relación del tipo de lignina durante el almacenamiento.  | 99     |

# 1. INTRODUCCIÓN

La jícama (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) es una leguminosa tropical originaria de México y América Central. Fue cultivada por las culturas mesoamericanas como la Maya y la Azteca. Los primeros exploradores españoles y portugueses la llevaron a varias regiones de Latinoamérica y a muchas islas del Pacífico como las Filipinas y de allí se extendió a Oceanía y Asia. Actualmente se cultiva en México, Brasil, Estados Unidos (Florida y Hawaii), China, Indonesia, Filipinas y Nigeria, pero en casi todos los casos se trata de un cultivo subexplotado (Sørensen, 1996; Casanueva, 1995; Fernández et al., 1996).

En la actualidad, su cultivo se encuentra ampliamente distribuido en la República Mexicana bajo diferentes sistemas de producción, adquiriendo cada vez mayor importancia debido al creciente aumento en las exportaciones realizadas principalmente a los Estados Unidos de Norteamérica (Heredia-Zepeda y Heredia-García, 1994). En el año agrícola de 1999, se produjeron 107,827 toneladas. Los cinco estados con mayor producción fueron Nayarit (44.14%), Morelos (18.18%), Michoacán (14.34%), Guanajuato (7.25%) y Puebla (6.06%), que aportaron casi el 90% de la producción nacional (SAGARH, 1999).

En el aspecto socioeconómico, este cultivo resulta importante debido a que aproximadamente un 50% de los productores dedicados a este cultivo pertenecen a familias de escasos recursos económicos (Heredia-Zepeda y Heredia-García, 1994).

Su consumo se realiza en diferentes formas: (i) como producto fresco, las raíces son cortadas en tiras y se les adiciona jugo de limón y chile; (ii) como una hortaliza fresca, las rebanadas se usan en diferentes ensaladas; (iii) mezclada con otras hortalizas, se utiliza para la preparación de sopas; (iv) como rebanadas fritas o (v) cortada en diferentes formas puede ser conservada en vinagre con cebolla y chile. En otros países, los usos también son múltiples. Uno de ellos es como sustituto de la castaña de agua (*Eleocharis dulcis*) en la comida china por su gran

similitud en cuanto a textura y sabor (Casanueva, 1995; Sørensen, 1996; Rubatzky y Yamaguchi, 1997). Este aspecto es uno de los factores que motiva la exportación de jícama al mercado de Estados Unidos para satisfacer los requerimientos de este tipo de restaurantes.

Una forma de incrementar su comercialización y darle mayor valor agregado es ofrecerla como producto mínimamente procesado. Los productos mínimamente procesados son frutas y hortalizas listos para su consumo los cuales no han sido cocinados, enlatados, congelados, secados o sometidos a algún otro proceso para conservarlos por largo tiempo (USDA, 1993).

Estos productos tienen amplia aceptación en países como los Estados Unidos, Francia, Reino Unido y Holanda, entre otros (Watada et al., 1996), lo cual representa una ventaja adicional para ofrecer a la jícama mínimamente procesada en los mercados de exportación.

Las ventajas potenciales que los productos mínimamente procesados proporcionan al consumidor son: mayor acceso a frutas y hortalizas saludables, no utilizan aditivos o conservadores, pueden almacenarse en su empaque, disminuyen el espacio de almacenamiento, reducen el tiempo de preparación, proporcionan una calidad más uniforme y consistente y reducen el desperdicio por parte del consumidor (Cantwell, 1998a). Esta alternativa de producción de jícama mínimamente procesada es altamente viable si se considera que dentro del mercado de Estados Unidos existe una gran proporción de población de origen mexicano que estarían dispuestos a consumir este producto, debiéndose también recordar que esta raíz no es posible cultivarla en ese país debido a que no reúne las condiciones climáticas que el cultivo de la jícama requiere.

No obstante, para que la aplicación de esta tecnología sea más eficiente, se deben resolver algunos problemas que este tipo de productos presenta en mayor o menor medida, como es el caso del oscurecimiento. Aquino-Bolaños et al. (2000) reportaron que el oscurecimiento es una de las principales causas de pérdida de calidad en jícama mínimamente procesada.

Las explicaciones científicas actuales al fenómeno de oscurecimiento se basan fundamentalmente en la reacción de oxidación que lleva a cabo la enzima polifenol oxidasa (PPO) sobre los fenoles para transformarlos en quinonas, las cuales a su vez se polimerizan o reaccionan con compuestos que contienen grupos amino para formar los compuestos coloridos causantes del problema (Lee y Whitaker, 1995). Basados en estos conceptos se desarrollan estrategias para el control de estas reacciones de oscurecimiento como son el uso de compuestos que inhiben la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO). Sin embargo, su eficiencia no es tan alta o sólo un número limitado de ellos se consideran seguros para la salud y accesibles económicamente (Lee y Whitaker, 1995), por lo que es necesario buscar nuevas alternativas para evitar el oscurecimiento. Esto se podrá lograr a través de un mejor entendimiento de los mecanismos que están involucrados en este proceso.

En el presente trabajo, se muestran evidencias científicas que sostienen que el oscurecimiento en jícama mínimamente procesada se debe a la síntesis de ligninas, las cuales tienen como finalidad cicatrizar los tejidos dañados mecánicamente. Este mecanismo postula que el metabolismo de síntesis de las ligninas obedece a un proceso programado que se activa por el estrés mecánico, lo cual genera ligninas de color café que originan el problema de oscurecimiento y se contrapone al concepto generalmente aceptado que el oscurecimiento en productos mínimamente procesados se debe a la descompartamentación de los fenoles, que facilita que se pongan en contacto con la polifenol oxidasa y se produzca el oscurecimiento.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Importancia de la jícama

La producción nacional de jícama en 1999 fue de 107,827 toneladas. En la actualidad, su cultivo se encuentra distribuido ampliamente en la República Mexicana en diferentes estados. En el Cuadro 1 se enlistan los principales estados productores, así como su volumen de producción en toneladas por año.

Cuadro 2.1. Principales estados productores de jícama.

| <b>Estados</b>          | <b>Toneladas/año</b> |
|-------------------------|----------------------|
| Aguascalientes          | 12                   |
| Baja California Sur     | 20                   |
| Guanajuato              | 7827                 |
| Guerrero                | 5637                 |
| Jalisco                 | 1256                 |
| México                  | 144                  |
| Michoacán               | 15463                |
| Morelos                 | 19610                |
| Nayarit                 | 47596                |
| Puebla                  | 6545                 |
| San Luis Potosí         | 384                  |
| Sinaloa                 | 702                  |
| Tamaulipas              | 166                  |
| Veracruz                | 2150                 |
| Yucatán                 | 300                  |
| Zacatecas               | 15                   |
| <i>Producción total</i> | <b>107827</b>        |

(SAGARH, 1999).

Desde el punto de vista nutricional, esta raíz tiene aspectos muy relevantes. En el Cuadro 2 se muestra su composición nutrimental comparada con otras hortalizas de amplio consumo en nuestra dieta.

Cuadro 2.2. Comparación de la composición nutrimental de la jícama con otras raíces (en 100 g de materia húmeda).

| <b>NUTRIMENTOS</b>    | <b>JÍCAMA</b> | <b>CAMOTE</b> | <b>ZANAHORIA</b> | <b>PAPA</b> |
|-----------------------|---------------|---------------|------------------|-------------|
| Energía (Kcal)        | 39            | 103           | 44               | 76          |
| Humedad (%)           | 78-90         | 70.6          | 88.2             | 81          |
| Proteína (g)          | 1.0-1.5       | 1.0           | 0.4              | 1.6         |
| Lípidos (g)           | 0.09-0.8      | 0.4           | 0.3              | 0.1         |
| Carbohidratos (g)     | 8-15          | 24            | 10.5             | 17.5        |
| Fibra (g)             | 0.6-1.4       | 1.0           | 0.9              | 0.5         |
| <b>Vitaminas (mg)</b> |               |               |                  |             |
| Ac. ascórbico         | 14-20         | 23            | 19               | 15          |
| Tiamina               | 0.05-0.5      | 0.09          | 0.04             | 0.07        |
| Riboflavina           | 2             | 0.03          | 0.5              | 0.03        |
| Niacina               | 2             | 0.6           | 0.5              | 1.1         |
| <b>Minerales (mg)</b> |               |               |                  |             |
| Calcio                | 13-16         | 41            | 26               | 13          |
| Fósforo               | 16            | ----          | ----             | ----        |
| Hierro                | 0.5-1.1       | 1.0           | 0.6              | 2.7         |
| Cobre                 | 43            | ----          | ----             | ----        |

Sørensen (1996), Instituto Nacional de la Nutrición (1997).

La jícama es un producto que aporta menos carbohidratos y energía que la papa y el camote. Su contenido de proteína es mayor respecto de la zanahoria y es comparable con el que aporta el camote. En cuanto a su contenido de fibra, éste es relevante ya que representa 0.6 al 1.4 %. Su contenido de tiamina, riboflavina y niacina supera el registrado para la papa, la zanahoria y el camote. Estos aspectos en su conjunto hacen de la jícama un producto sumamente

interesante desde el punto de vista nutricional, ya que puede ser empleada en regímenes dietéticos para el control de peso y mejorar la digestión en el tracto intestinal.

## **2.2. Productos mínimamente procesados**

Los productos mínimamente procesados también llamados ligeramente procesados, parcialmente procesados, procesados frescos y precortados, son frutas y hortalizas las cuales han sido preparadas para uso inmediato en la industria del servicio de alimentos o del consumidor (Cantwell, 1998a). Las operaciones que involucran un procesamiento mínimo son: lavado, clasificado, mondado, deshojado y rebanado; manteniendo siempre una calidad similar a una fruta u hortaliza fresca (Burns, 1995).

### **2.2.1. Calidad de los productos mínimamente procesados**

La calidad de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas es una combinación de atributos que determinan su valor como alimento humano. Estos factores de calidad incluyen: apariencia visual (frescura, color, defectos y pudriciones), textura (crujencia, jugosidad, firmeza e integridad del tejido), sabor, olor, valor nutritivo (vitaminas A y C, minerales y fibra dietaria) y seguridad (ausencia de residuos químicos y contaminación microbiana). La calidad de los productos mínimamente procesados depende de la calidad del producto intacto o materia prima, de la preparación y de las condiciones en que se maneje hasta llegar al consumidor (Kader y Mitcham, 1998).

### **2.2.2. Efectos físicos y fisiológicos importantes del procesamiento mínimo**

La preparación de frutas y hortalizas mínimamente procesadas implica daño físico del tejido. Este proceso inherente provoca una serie de respuestas físicas y fisiológicas que incrementan la velocidad de deterioro de estos productos (Cantwell, 1998b).

### **2.2.2.1. Efectos físicos del daño mecánico**

El efecto físico inmediato del acto mecánico de corte en el tejido es la remoción de la capa epidérmica protectora, la liberación de los fluidos intercelulares a la superficie y la exposición del tejido a los contaminantes. Posteriormente, cuando el agua de la superficie se evapora y el tejido empieza a responder fisiológicamente, hay una alteración en la difusión de gas y en la apariencia de la superficie (Saltveit, 1998).

Una célula vegetal contiene muchos compuestos que son conservados en compartimentos separados por membranas semipermeables. El corte daña físicamente las membranas con lo cual los compuestos inicialmente compartimentalizados, se mezclan y producen reacciones indeseables e incontrolables. Por ejemplo, los compuestos fenólicos de la vacuola se mezclan con las enzimas en el citoplasma para producir compuestos coloreados y con ello el oscurecimiento del tejido (Saltveit, 1998 ; Brecht, 1995).

### **2.2.2.2. Efectos fisiológicos del daño mecánico**

El daño afecta una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos. En segundos, hay una señal en el tejido dañado que se propaga al tejido adyacente e induce respuestas en cadena que disminuyen la calidad de los productos mínimamente procesados (Saltveit, 1998). Las principales respuestas fisiológicas del daño mecánico son:

#### ***Inducción de la síntesis de etileno***

Una respuesta rápida al daño es el incremento en la velocidad de respiración y producción de etileno. Estos aumentos se pueden inducir a través de una mezcla no controlada de componentes celulares (por ejemplo con el cambio en la permeabilidad de las membranas) o a través de mecanismos controlados de reparación celular (Saltveit, 1998). Un ejemplo es el tomate que al ser cortado en

pequeñas rodajas (1 cm) incrementó su producción de etileno hasta 20 veces comparado con el tomate entero (Watada et al., 1990). Un comportamiento similar se observó en discos de kiwi almacenados a 20°C que después de 2-4 horas del corte presentaron una producción de etileno 7 veces mayor que en kiwi intacto (Varoquaux et al., 1990). Rossen y Kader (1989) encontraron un incremento de etileno 4 veces mayor en fresa cortada en rebanadas que en fresa intacta.

### ***Degradación de la membrana lipídica***

El daño en el tejido de las plantas durante la preparación de productos mínimamente procesados puede causar una degradación de los lípidos de la membrana (Rolle y Chism, 1987), donde también puede ocurrir una degradación enzimática, causando pérdidas de componentes lipídicos y pérdida de compartimentalización de enzimas y sustratos. Las reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima acil lipo hidrolasa y fosfolipasa D liberan ácidos grasos de la membrana lipídica; estos ácidos grasos libres son tóxicos para muchos procesos celulares y son capaces de causar lisis en los organelos e inactivar proteínas (Brecht, 1995).

### ***Incremento en la tasa de respiración***

Una velocidad de respiración más alta indica un metabolismo más rápido. Dado que el resultado final de la actividad respiratoria es el deterioro y senescencia del producto, es deseable alcanzar una velocidad de respiración tan baja como sea posible sin causar daño o muerte al tejido.

La respiración en los productos mínimamente procesados generalmente aumenta. Por ejemplo la zanahoria al ser cortada en piezas de 2 pulgadas, su respiración aumentó en un intervalo de 25 al 50%; también la lechuga cortada aumentó su tasa de respiración de 2-3 veces. La velocidad de respiración de la zanahoria pelada entera fue de 6  $\mu\text{l/gh}$ , mientras que cortada en forma de discos o tiras su velocidad se incrementó a 8 y 12  $\mu\text{l/gh}$ , respectivamente. En la col también

se incrementó la velocidad de respiración a 6, 13 y 17  $\mu\text{l}/\text{gh}$ , al ser cortada en cuartos, tiras de 0.5 x 3 cm o en tiras de 0.25 x 1.5 cm, respectivamente (Cantwell, 1998b). Estos resultados indican que el grado de daño es un factor que influye en la velocidad de respiración de los productos mínimamente procesados. Es decir, a mayor grado de daño hay siempre una tasa de respiración mayor.

### ***Pérdida de agua***

El tejido de los vegetales está en equilibrio con una atmósfera a la misma temperatura y humedad relativa interna estimada en los tejidos vegetales de 99% a 99.5% (Burton, 1982). La reducción de la presión de vapor de agua en la atmósfera comparada con la del tejido provoca la pérdida de agua. En órganos intactos, el agua de los espacios intercelulares no está directamente expuesta a la atmósfera exterior; sin embargo, el corte o eliminación de la cáscara expone el interior del tejido y drásticamente se incrementa la velocidad de evaporación del agua. La diferencia de la velocidad de pérdida de agua entre la superficie de plantas intactas y dañadas varía de 5 a 500 veces dependiendo de si la superficie está o no suberizada (Brecht, 1995).

### ***Oscurecimiento oxidativo***

El cambio de color es uno de los principales problemas y uno de los factores limitantes que presentan los productos mínimamente procesados; ocurre en la superficie de corte como resultado del rompimiento de las células que son dañadas, permitiendo que sustratos y oxidantes se pongan en contacto (Rolle y Chism, 1987). El daño también induce la síntesis de algunas enzimas involucradas en reacciones o biosíntesis de diferentes compuestos. En el tejido de camote, por ejemplo, el daño mecánico al obtener discos provocó incremento en la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), ác. trans-cinámico 4-hidroxilasa, peroxidasa, o-difenol oxidasa y citocromo C-O<sub>2</sub> oxidoreductasa (Tanaka y Uritani, 1977).

En muchos casos, la síntesis, oxidación y polimerización de los fenoles son los factores a los que se ha atribuido el cambio de color. De acuerdo con Hanson y Haver (1979), el oscurecimiento ocurre cuando los productos del metabolismo de los fenil propanoides, como los fenoles y posiblemente otros sustratos (por ejemplo las antocianinas) se oxidan en reacciones catalizadas por fenolasas (polifenol oxidasa o peroxidasas). La correlación de síntesis de fenoles y cambios de color ha sido descrita en varios trabajos. Hyodo et al. (1978) encontraron una alta correlación entre la actividad de PAL (inducida por etileno) y la aparición del moteado oscuro en hojas de lechuga. López-Gálvez et al. (1996) también describen que la actividad de esta enzima se incrementó de 2.5 y 3 veces a 5 y a 15°C, respectivamente. El incremento de la actividad de PAL se correlacionó con un mayor oscurecimiento.

### ***Cicatrización de heridas***

En respuesta al daño, las plantas sintetizan una serie de compuestos los cuales parecen estar relacionados con la reparación del daño o como un mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos e insectos. Los metabolitos secundarios que se producen, dependen de la planta y del tejido involucrado. En ciertos casos, estos compuestos pueden afectar el aroma, sabor, apariencia, valor nutritivo o seguridad de los productos mínimamente procesados. Los compuestos producidos por frutas y hortalizas dañadas incluyen fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, ácidos grasos y alcoholes de cadena larga (Miller, 1992).

La cicatrización de heridas se refiere a la producción de suberina y lignina en las paredes celulares del sitio del daño, seguida por una división celular para formar un peridermo (Burton, 1982). La suberización de las células cercanas al daño ocurre en muchos tejidos, como la papa, la yuca (*Dioscorea sp*), el camote (*Ipomea batatas L.*) y la zanahoria (*Daucus carota L.*) (Kolattukudy, 1984).

### **2.3. Oscurecimiento enzimático: variables involucradas**

La percepción del color por parte de los consumidores en el momento de elegir los alimentos es decisiva en la compra del producto. El color aparte de las connotaciones hedónicas, nos puede informar acerca de muchas otras propiedades, tales como: el grado de madurez en el caso de las frutas, frescura del producto, manejo inadecuado, etc.

Uno de los principales objetivos en el procesamiento mínimo de frutas y hortalizas es conservar el color original para asegurar la aceptación del consumidor. Sin embargo, las operaciones unitarias involucradas en el procesado mínimo (lavar, pelar, tallar y la reducción de tamaño) permiten que las enzimas y los sustratos se pongan en contacto y promuevan las reacciones enzimáticas relacionadas con el deterioro del color (Dorantes-Alvarez y Chiralt, 2000).

La enzima polifenol oxidasa (PPO) está localizada en los plástidos y aunque está asociada a la membrana, no es una proteína integral de la misma. En tanto que los sustratos fenólicos están localizados en la vacuola y por lo tanto las reacciones de oscurecimiento solamente ocurren como resultado de la pérdida de compartimentalización celular, permitiendo la unión entre la enzima y el sustrato (Thygesen et al., 1995). De acuerdo a lo anterior, los principales factores involucrados en el proceso de oscurecimiento son los compuestos fenólicos y la actividad de la enzima PPO.

#### **2.3.1. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias que se caracterizan por tener un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo (OH). Su nombre deriva del compuesto más simple de ellos, el fenol, por lo que también son conocidos como fenoles. Están presentes en todos los tejidos de las plantas y frecuentemente constituyen el grupo más abundante de metabolitos secundarios en frutas (Macheix et al., 1990).

### **2.3.1.1. Importancia biológica**

El papel preciso de la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas no ha sido determinado aún, sin embargo, se ha señalado que son de gran importancia como materiales de soporte celular; forman una parte integral de la estructura de la pared celular, como es el caso de las ligninas y las suberinas que contribuyen al soporte mecánico y a la formación de 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).

Las fitoalexinas son compuestos fenólicos antimicrobianos que se inducen como resultado de haber sometido un tejido vegetal a una situación de estrés como ataque de patógenos, daño mecánico, baja temperatura, etc. 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, las furanocumarinas, los flavonoles, etc. (Dixon y Paiva, 1995).

### **2.3.1.2. Biosíntesis de fenoles en respuesta al daño mecánico**

La exposición de los tejidos de las plantas a factores que causan estrés o daño, tales como: el daño mecánico, los tratamientos químicos con metales pesados o etileno, la infección por hongos, bacterias o virus pueden estimular el metabolismo de los compuestos fenólicos (Kosuge, 1969). El daño o estrés causado por estos factores favorecen la pérdida del contenido de las células rotas y en las células cercanas al daño (estresadas pero no rotas) se inicia el proceso de reparación del daño a través de la inducción del metabolismo de los fenil propanoides.

Rhodes y Wooltorton (1978) señalaron que hay tres tipos de respuestas en el metabolismo de fenoles al estrés o daño. El primero involucra la oxidación de los compuestos fenólicos pre-existentes para producir quinonas y materiales poliméricos. Los otros dos tipos de respuesta involucran la síntesis de compuestos fenólicos monoméricos y poliméricos. La síntesis de fenoles monoméricos permite la acumulación de mayores cantidades de compuestos ya presentes en el tejido sin dañar o la aparición de nuevos compuestos, los cuales pueden tener un papel especial en los mecanismos de defensa del tejido o la prevención de infecciones.

### ***Oxidación de compuestos fenólicos pre-existentes***

Cuando los tejidos de las plantas son dañados, se considera que la polifenol oxidasa es la principal enzima involucrada en la oxidación de fenoles endógenos. Los requerimientos para inducir esta respuesta son: la presencia de la enzima, la disponibilidad de un sustrato apropiado y el oxígeno.

Las reacciones de oscurecimiento enzimático son activadas con el daño mecánico. *In vivo*, las enzimas y los sustratos están contenidos en compartimentos celulares separados y con el daño, se destruye la compartimentalización. Lagrimini (1991) indicó que además de PPO, la enzima peroxidasa también cataliza la oxidación de los fenil propanoides produciendo compuestos con propiedades similares a las ligninas.

### ***Biosíntesis de compuestos fenólicos monoméricos***

Los compuestos fenólicos se forman a partir del fosfoenol piruvato y la eritrosa 4-fosfato, en la ruta biosintética del ácido siquímico. El metabolismo de los compuestos fenólicos se puede dividir en dos: el metabolismo general, que es requerido para la síntesis de todos los metabolitos fenólicos y el metabolismo específico, el cual necesita la adición de otras vías metabólicas (Douglas et al., 1992).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza el primer paso de la síntesis de los fenilpropanoides, en la que se produce el ác. trans-cinámico por desaminación de la fenilalanina. El ácido cinámico es hidroxilado por la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H) para dar lugar al ácido *p*-cumárico. La enzima 4-cumarato CoA ligasa (4CL) cataliza el tercer y último paso en el metabolismo general de los fenilpropanoides, la formación del 4-cumaroil CoA y de sus derivados (Douglas, 1992).

Una respuesta general al daño ocasionado a las plantas es el incremento en la síntesis de derivados del ácido cinámico. Estos compuestos están presentes en el tejido intacto y su acumulación es estimulada por el daño. Entre los derivados del ácido cinámico que se acumulan bajo estas circunstancias, se encuentran el ác. clorogénico y el ác. caféico, aunque el papel que desempeñan estos compuestos en la reparación del daño no está claro.

Los ácidos cinámicos libres son metabolitos intermediarios en la ruta biosintética de la formación de los fenilpropanoides. Sin embargo, los ácidos cinámicos están normalmente almacenados como glucósidos o ésteres, más que como ácidos libres. La presencia de glucósidos de ácidos cinámicos ha sido descrita por Harborne (1974).

### ***Biosíntesis de polifenoles poliméricos***

Una respuesta común de las plantas al daño es formar una capa de material protector sobre la superficie cortada, la cual forma una barrera contra la pérdida de agua y contra la invasión de microorganismos. El material formado es suberina o lignina. La suberina es un polímero de ácidos grasos de cadena larga en los cuales los ácidos cinámicos tales como los ác. ferúlico y *p*-cumárico son incorporados por enlaces covalentes. La lignina es un polímero de fenoles, los cuales incorporan unidades de fenilpropanoides en una estructura compleja y altamente condensada.

### 2.3.2. Polifenol oxidasa (PPO)

El término de polifenol oxidasa se refiere a varias enzimas, las cuales tienen como principal característica su capacidad para usar el oxígeno molecular durante la oxidación de los compuestos fenólicos. Estas enzimas pueden ser divididas en dos grupos principales.

El primero de ellos, las catecol oxidasas (E.C.1.10.3.1), catalizan dos distintas reacciones: la hidroxilación de monofenoles para producir *o*-difenoles (reacción 1) y la oxidación de *o*-difenoles para producir *o*-quinonas (reacción 2) (Figura 2.1). Estas dos reacciones enzimáticas son referidas como la actividad monofenolasa (*o*-cresolasa) y la actividad *o*-difenoloxidasa (*o*-catecolasa), respectivamente (Nicolas et al., 1994; Lee y Whitaker, 1995).

El segundo grupo, las lacasas (E.C. 1.10.3.2) oxidan a los *o*-difenoles así como también a los *p*-difenoles, formando las correspondientes quinonas (reacción 3). La mayoría de las polifenol oxidasas involucradas en el oscurecimiento de frutas son las *o*-difenol oxidasas (Macheix et al., 1990; Vámos-Vigiyázó, 1981).

Las enzimas PPO contienen  $\text{Cu}^{2+}$  como grupo prostético, el cual es reducido a  $\text{Cu}^{1+}$  para que la enzima actúe sobre los sustratos fenólicos. En tal estado, la enzima puede enlazar  $\text{O}_2$ , produciendo la hidroxilación de monofenoles o la oxidación de difenoles a quinonas (Thygesen et al., 1995).

Las *o*-quinonas formadas son precursores del oscurecimiento y por sí solas poseen poco color, pero se encuentran entre los compuestos intermedarios más reactivos que se presentan en las plantas. Las *o*-quinonas intervienen en reacciones secundarias, produciendo compuestos con mayor intensidad de color (Lee y Whitaker, 1995).

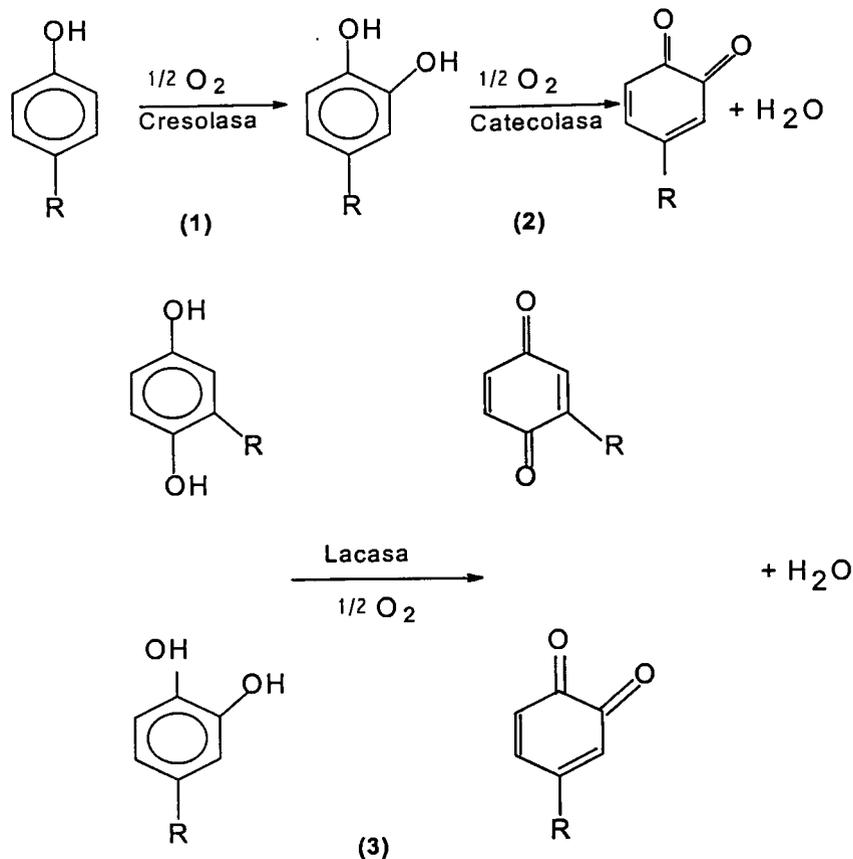


Figura 2.1. Reacciones catalizadas por PPO (Adaptado de Nicolas et al., 1994).

Las *o*-quinonas reaccionan con otra molécula de fenol, produciendo dímeros del fenol original. Estos dímeros, con una estructura de *o*-difenol, pueden ser sujetos a reoxidación enzimática o química, con lo cual se forman oligómeros mayores con diferente intensidad de color. Las *o*-quinonas pueden también reaccionar con una molécula de fenol diferente, formando un copolímero o regenerando al fenol original por oxidación acoplada (Nicolas et al., 1994).

Las *o*-quinonas también pueden polimerizarse y reaccionar con grupos de aminoácidos de proteínas celulares, dando como resultado depósitos de pigmentos negros u oscuros, los cuales son característicos de las reacciones de oscurecimiento enzimático seguidas del daño a las plantas (Thygesen et al., 1995; Rhodes y Wooltorton, 1978).

### **2.3.2.1. Localización de PPO en las plantas.**

PPO es una enzima intracelular en las plantas, excepto en algunos casos en los que se ha encontrado en la fracción de la pared celular. La enzima se ha localizado principalmente en la fracción soluble del plasma celular y en organelos como: cloroplastos, mitocondrias, microsomas y peroxisomas, donde está unida fuertemente a las membranas (Kato et al., 1976; Mayer y Harel, 1979).

También se ha sugerido que PPO está localizada exclusivamente en plástidos y solamente es liberada al citosol por efecto del daño, senescencia o deterioro del organelo. La conversión de formas insolubles de la enzima a formas solubles se presenta en los frutos cuando éstos son expuestos a condiciones de estrés o durante la maduración y el almacenamiento. Las reacciones de oscurecimiento que se llevan a cabo después del rompimiento del tejido rico en PPO podrían causar el enlace de la PPO soluble a la fracción insoluble.

La actividad de PPO puede ser totalmente diferente, dependiendo del tejido estudiado o del tipo de extracción que se realice. En el caso del plátano y la ciruela, la actividad de PPO es mayor en la pulpa que en la cáscara del fruto. Un resultado opuesto se encontró en la manzana y en la pera, donde la actividad de PPO es sustancialmente mayor en la piel que en la pulpa. En mango, la actividad en la piel y en la pulpa se relacionó con el estado de desarrollo de este fruto (Macheix et al., 1990).

### **2.3. 2.2. Especificidad del sustrato**

En las plantas superiores, PPO actúa sobre un amplio intervalo de compuestos fenólicos (mono y *o*-difenoles). Para el mismo sustrato, se encuentran grandes diferencias en los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) dependiendo de la fuente (género, cultivar y aún del tejido a partir del cual se hizo la extracción) y de la pureza de la enzima (Vámos-Vigyázó, 1981).

El catecol y el 4-metil catecol son los sustratos que se utilizan con mayor frecuencia para medir la actividad de PPO; sin embargo, estos compuestos fenólicos no son sustratos naturales dado que no se acumulan en frutos aún cuando la enzima tenga la afinidad más fuerte hacia ellos (Macheix et al., 1990).

En frutas y hortalizas, los sustratos fenólicos más importantes para PPO son las catequinas, los ésteres del ácido cinámico como el ácido clorogénico, la 3,4-dihidroxi fenilalanina (DOPA) y la tirosina. El tipo y la posición de los sustituyentes presentes en los mono y *o*-dihidroxi fenoles son también importantes y determinan la reactividad del sustrato (Zawistowski et al., 1991).

Otros compuestos fenólicos presentes en grandes cantidades en frutos no parecen ser sustratos para las *o*-difenol oxidasas, pero su degradación es fuertemente incrementada a través de reacciones de oxidación acoplada. Cheynier et al. (1988) y Oszmianski y Lee (1990) trabajando con sistemas modelo observaron que la velocidad de oxidación de la catequina en una mezcla de catequina y ác. clorogénico fue mayor que la velocidad de oxidación de la catequina sola y también fue mayor el grado de oscurecimiento después de 2 horas de reacción; ésto puede ser debido a que las quinonas del ác. clorogénico oxidaron a la catequina por mecanismos de reacción acoplada, lo cual indica que la intensidad del oscurecimiento depende del tipo de compuestos fenólicos que se encuentren presentes en el fruto.

### **2.3.2.3. Correlación entre compuestos fenólicos, actividad de PPO y oscurecimiento**

Las correlaciones que se han establecido entre los compuestos fenólicos y el desarrollo de oscurecimiento no han sido muy claras. Por ejemplo, el ácido clorogénico es el compuesto fenólico más abundante en la papa, donde constituye aproximadamente el 90% de todos los fenoles; sin embargo, no se encontró una alta correlación entre el contenido de este fenol con su potencial o susceptibilidad al oscurecimiento (Friedman, 1997).

En estudios realizados con manzana, Amiot et al. (1992) determinaron que ninguno de los compuestos fenólicos presentes se correlacionó con la susceptibilidad al oscurecimiento (estimada mediante la absorbancia a 400 nm y el valor de luminosidad L\*) o la actividad de PPO.

Por su parte, Coseteng y Lee (1985) tampoco observaron una alta correlación entre el grado de oscurecimiento de siete cultivares de manzana con su respectiva actividad de PPO. Aunque se obtuvo una mejor correlación entre el grado de oscurecimiento y la actividad de PPO o fenoles totales cuando los cultivares se dividieron en dos grupos.

Lee et al. (1990), en un estudio encaminado a correlacionar los compuestos fenólicos individuales con la actividad de PPO y el grado de oscurecimiento en varios cultivares de durazno, desde su maduración hasta la cosecha, encontraron que los compuestos fenólicos más abundantes fueron: la catequina, la procianidina B3, el ácido clorogénico, el ácido neoclorogénico y el ácido caféico, existiendo grandes diferencias en la concentración de los compuestos fenólicos y la actividad de PPO, entre los diferentes cultivares. El coeficiente de correlación de la actividad de PPO con el oscurecimiento fue de  $r = 0.65$  y de  $r = 0.67$  entre el contenido de fenoles y el oscurecimiento. Estas correlaciones para cada uno de los fenoles en particular fueron de 0.60, 0.64, 0.46, 0.41 y 0.09 para el ácido clorogénico, el neoclorogénico, la procianidina B3, la catequina y el ácido caféico, respectivamente.

En chabacanos, la composición de fenoles difirió significativamente entre los cultivares, pero solo para unos cuantos, el oscurecimiento estuvo ligado al contenido de *o*-fenoles (Vámos-Vigyázó, 1981). El ácido clorogénico fue degradado rápidamente durante el oscurecimiento enzimático, pero la susceptibilidad a este fenómeno pareció estar más fuertemente correlacionada con la cantidad inicial de flavan-3-oles (monómeros de catequina y procianidinas) (Radi et al. (1997).

Amiot et al. (1995) estudió la influencia del cultivar, estado de madurez y condiciones de almacenamiento sobre la composición de fenoles y el desarrollo de

oscurecimiento enzimático en la pera. La intensidad del oscurecimiento en la piel pudo ser explicada por un mayor contenido de fenoles. La pulpa contuvo principalmente ác. hidroxicinámicos y flavonoles. Durante el oscurecimiento, todos los compuestos fenólicos fueron afectados; sin embargo, el ác. 5'-cafeoilquinico y los flavanoles fueron más degradados que los flavonoles. Dado que los flavanoles no son buenos sustratos para PPO, se sugirió que estos fueron degradados a través de reacciones acopladas (Goupy et al., 1995).

Larrigaudiere et al. (1998) estudiaron también la relación entre el oscurecimiento enzimático y los desórdenes internos en pera almacenada en atmósferas controladas, sin encontrar correlación entre la actividad de PPO y el oscurecimiento del corazón del fruto.

Todos los estudios indicados anteriormente realizados con diferentes productos, grados de madurez y condiciones de almacenamiento dan evidencia que las reacciones de oscurecimiento constituyen un proceso complejo que involucra probablemente varios factores como pueden ser los niveles y tipos de sustrato, actividad de la enzima y otros inhibidores o promotores de la misma. También pudiera ser que en el sistema estén participando otros procesos que no necesariamente tengan que ver con las reacciones catalizadas por PPO.

#### **2. 4. Proceso de lignificación**

El daño mecánico provocado al tejido induce un mecanismo de defensa que incluye la formación de una barrera natural para protegerse de la pérdida de agua y de la invasión por microorganismos. Esta barrera está compuesta de ligninas y suberinas (Rhodes y Woollorton, 1978).

Desde el punto de vista químico, las ligninas son polímeros de compuestos fenólicos, formados por tres alcoholes hidroxicinámicos (monolignoles): el *p*-cumarílico, el coniferílico y el sinapílico. Estos monolignoles también forman enlaces con otros polímeros de la pared celular como polisacáridos y proteínas (Whetten et al., 1998).

Desde el punto de vista funcional, las ligninas son compuestos que dan fuerza a la pared celular, facilitan el transporte de agua e impiden la degradación de los polisacáridos de la pared celular, por lo cual actúan como una barrera de defensa contra microorganismos, insectos, patógenos, etc. (Hatfield y Vermerris 2001).

Whetten et al. (1998) han clasificado a las ligninas presentes en las plantas superiores en dos grupos:

1) Ligninas de plantas gimnospermas, las cuales principalmente contienen subunidades de guaiacilo (también llamadas unidades G), polimerizadas a partir del alcohol coniferílico, y una pequeña proporción de unidades de 4-hidroxifenilo (unidades H) polimerizadas a partir del alcohol *p*-cumarílico.

2) Ligninas de plantas angiospermas, las cuales contienen unidades de siringilo (unidades S), polimerizadas a partir del alcohol sinapílico, y unidades G y sólo una pequeña proporción de unidades H.

#### **2.4.1. Biosíntesis de los monolignoles**

La biosíntesis de los monolignoles se inicia a partir del metabolismo general de los fenil propanoides descrito en el apartado 2.3.1.2. La Figura 2.2 esquematiza la biosíntesis de los monolignoles. Se considera que el ácido caféico es el producto de la hidroxilación del ác. *p*-cumárico por la enzima *p*-cumarato-3-hidroxilasa (C3H), pero el mecanismo por el cual se sintetiza no está aún probado.

El ácido caféico es metilado para formar ácido ferúlico por medio de la enzima ác. caféico 3-O-metil transferasa (C-OMT; EC2.1.1.68) usando S-adenosil metionina como grupo donador del metilo. Esta metilación limita la reactividad del grupo 3-hidroxilo y reduce el número de sitios sobre el anillo aromático que pueden formar enlaces con otras moléculas de monolignoles durante la polimerización.

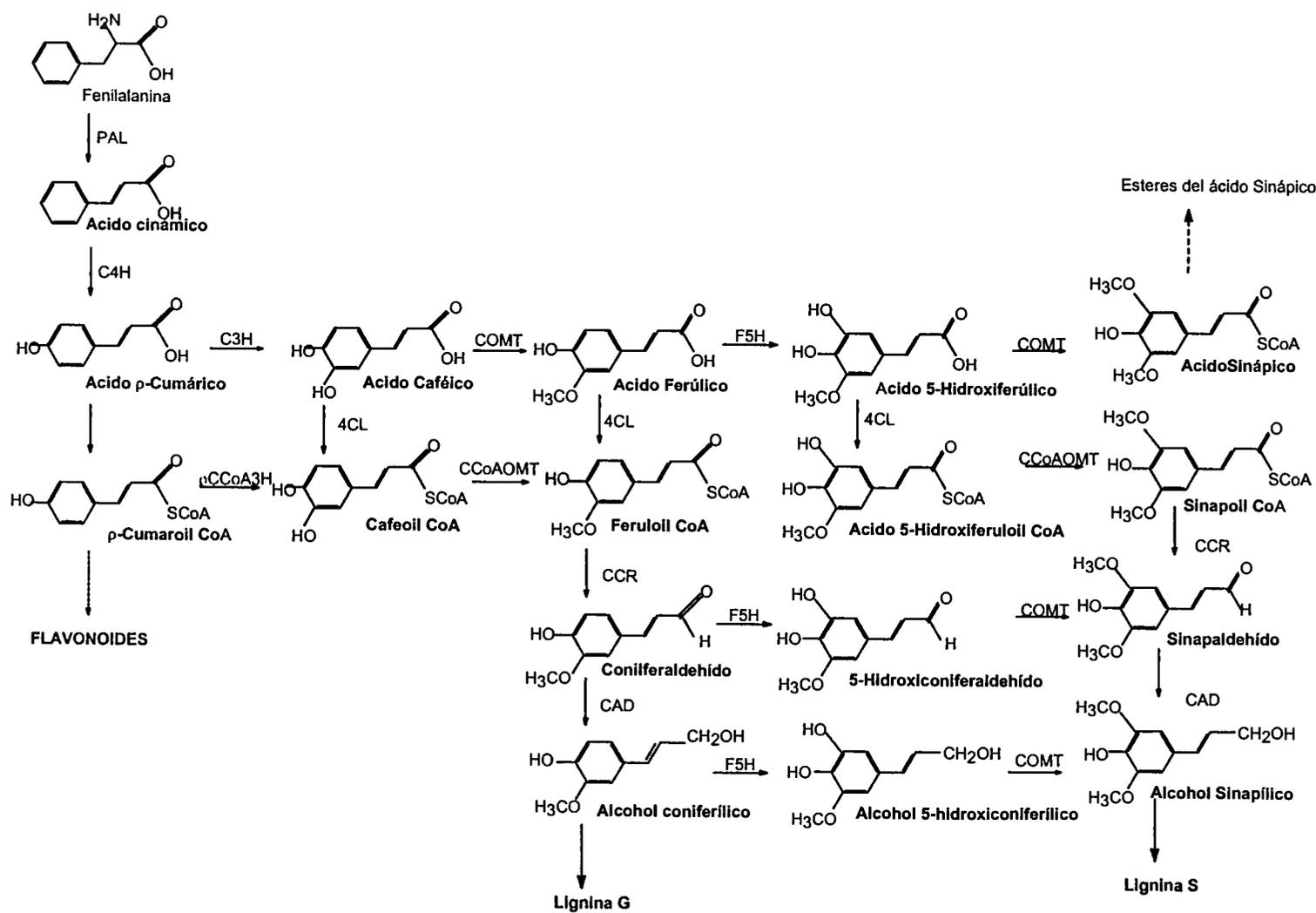


Figura 2.2. Biosíntesis de monolignoles (adaptado de Humphreys et al., 1999)

La hidroxilación del ferulato a 5-hidroxiferulato está catalizada por la enzima ferulato 5-hidroxilasa (F5H), esta enzima ha sido implicada en las diferencias de la composición de las ligninas entre angiospermas y gimnospermas. La hidroxilación del ferulato es un paso esencial para la formación del alcohol sinapílico.

La enzima 4-cumarato CoA ligasa (4CL; EC 6.2.1.12) cataliza la formación de tioésteres CoA de ácidos hidroxicinámicos en la biosíntesis de una amplia variedad de derivados fenólicos, incluyendo ác. benzoicos y taninos condensados, flavonoides y los alcoholes cinamílicos (Gross, 1985).

La reducción de tioésteres de hidroxicinamoil-CoA a los correspondientes aldehídos está catalizada por la enzima cinamoil-CoA reductasa (CCR; EC 1.2.1.44). En general, CCR no exhibe mucha especificidad por alguno de los sustratos hidroxicinamoil-CoA.

La reducción de los hidroxicinamaldehídos a los alcoholes hidroxicinamílicos está catalizada por la enzima cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD; EC 1.1.1.195). CAD ha sido considerada un indicador de la biosíntesis de las ligninas debido a su papel específico al final de la ruta de biosíntesis de los monolignoles. Las diferencias en la afinidad por el sustrato de la enzima CAD obtenida de angiospermas y gimnospermas podría tener un papel importante en el control de la formación de los diferentes tipos de lignina. CAD obtenida de gimnospermas generalmente es mucho más activa con coniferaldehído, mientras que CAD obtenida de angiospermas muestra actividades similares con coniferaldehído y sinapaldehído (Gross, 1985).

#### **2.4.2 Transporte de monolignoles a la pared celular**

Los monolignoles *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, los cuales son sintetizados en el citoplasma, son compuestos relativamente tóxicos e inestables, por lo que rápidamente son glucosilados formando los 4-O- $\beta$ -D-glucósidos como el

alcohol *p*-hidroxicinamilo glucósido, la coniferina y la siringina, respectivamente. Estos glucósidos son las formas transportables de los monolignoles, los cuales son secretados a la pared celular. En este sitio, la glucosa es removida por una  $\beta$ -glucosidasa liberando al monolignol.

Los glucósidos se forman por la transferencia de un residuo de UDP-glucosa al grupo hidroxilo del monolignol, catalizado por una UDPG-glucosil transferasa específica. Se considera que la hidrólisis de la coniferina, el glucósido del alcohol coniferílico, es esencial para iniciar la polimerización del monolignol en la pared celular.

### **2.4.3. Importancia de la enzima peroxidasa (POD) en la biosíntesis de ligninas**

Las peroxidasas (E.C.1.11.1.7) pertenecen al grupo de las oxidoreductasas. Estas enzimas descomponen al peróxido de hidrógeno en presencia de un donador de hidrógeno. Reed (1975) las clasificó en tres grupos principales: las peroxidasas con ferriprotoporfirina, las verdoperoxidasas y las flavoperoxidasas.

El primer grupo contiene ferriprotoporfirina III como grupo prostético. Dentro de este grupo, se incluyen a las peroxidasas de las plantas superiores (nabo, rábano y raíz picante), animales y microorganismos.

El segundo grupo, las verdoperoxidasas, son de color verde y se encuentran principalmente en la leche (como lactoperoxidasas) y en animales. El grupo prostético de esta enzima es un núcleo de ferriprotoporfirina diferente a la ferriprotoporfirina III.

El tercer grupo, las flavoperoxidasas, han sido purificadas a partir de varios *Streptococos* y de tejido de animales. Su grupo prostético es el flavín adenín dinucleótido (FAD).

### **2.4.3.1. Localización de POD en las plantas**

Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son ubicuas en las plantas con tejido vascular. En las células de las plantas, se localizan principalmente en la pared celular, vacuolas y organelos de transporte; se han localizado también en el tonoplasto, plasmalema, mitocondria y microsomas (Robinson, 1991). El número de peroxidasas presentes y su actividad varían con el estado de desarrollo de la planta. De manera general, se ha señalado que se localizan en forma soluble en el citoplasma y en forma insoluble enlazada a la pared celular (Vámos-Vigiázó, 1981).

A las peroxidasas se les ha implicado en varias funciones metabólicas, primarias y secundarias, incluyendo la regulación de la elongación celular, el entrecruzamiento de la pared celular con los polisacáridos, reparación de daño y defensa contra patógenos (Lagrimini, 1991 ; Lagrimini et al., 1993).

Debido a su alta afinidad por los precursores de lignina, las peroxidasas aniónicas (con punto isoeléctrico  $pI= 3.5$ ) han sido implicadas en la lignificación y son consideradas parte importante dentro del metabolismo normal de la pared celular (Campa, 1991).

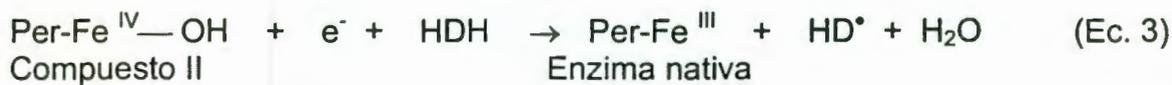
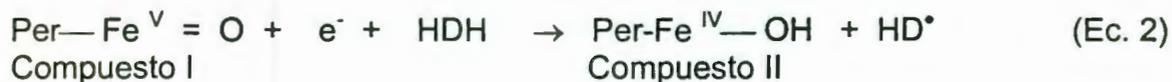
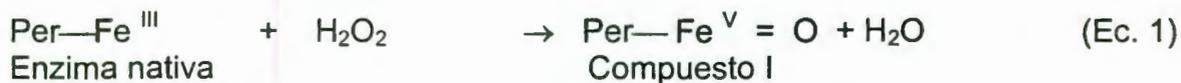
### **2.4.3.2. Mecanismo de reacción de POD**

Las peroxidasas catalizan reacciones de peroxidación, oxidación e hidroxilación. Estas enzimas utilizan un sustrato oxidante y un sustrato reductor. El sustrato oxidante es generalmente un peróxido o un peróxido de ácido, ROOH. Las peroxidasas pueden utilizar el peróxido de hidrógeno, el peróxido de metilhidrógeno y el peróxido de etil hidrógeno como agentes oxidantes en la reacción de peroxidación. La sustracción del hidrógeno ocurre rápidamente a partir de los sustratos fenólicos debido a la estabilización por resonancia del radical fenoxilo resultante. Los mono y dihidroxifenoles y compuestos complejos como el ácido clorogénico son sustratos potenciales para las peroxidasas (Robinson, 1991).

La reacción general de peroxidación catalizada por las peroxidases es la siguiente:



El primer paso del mecanismo de reacción involucra la oxidación del grupo prostético ferriprotoporfirina III de la enzima por  $\text{H}_2\text{O}_2$  o un hidroperóxido orgánico. La interacción de la enzima peroxidasa nativa ( $\text{Per—Fe}^{\text{III}}$ ) con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  produce un compuesto intermediario inestable, llamado compuesto I (Ec. 1), el cual reacciona con un donador de electrones (HDH) y pierde un equivalente oxidante para formar el compuesto II (Ec 2). El compuesto II obtiene un electrón más para retornar la enzima a su forma nativa (Ec. 3) (Campa, 1991).



Cada una de las reducciones requiere un solo electrón y un protón. Diferentes sustratos reductores convierten al compuesto I a la enzima nativa a través de la formación del compuesto II. La peroxidasa no es específica en su acción y cataliza la oxidación de una amplia variedad de fenoles que se encuentran naturalmente en los tejidos de las plantas. La reacción general involucra un ciclo de oxidación y regeneración de la enzima. Los radicales libres catiónicos formados ( $\text{HD}^\bullet$ ) derivados del sustrato donador de hidrógeno

reaccionan de manera no enzimática uno con otro para formar dímeros o polímeros (Robinson, 1991).

#### 2.4.3.3. Acoplamiento de monolignoles catalizado por peroxidasa

Las peroxidasas tienen un papel integral en la biosíntesis de la pared celular. En el último paso de la biosíntesis de ligninas, estas enzimas promueven el acoplamiento de los monolignoles a través de la formación de radicales (Ecuaciones 1 a 3), dependiente de  $H_2O_2$ . La polimerización de monolignoles catalizada por la peroxidasa involucra la formación de radicales fenoxílico (Figura 2.3) que se condensan de manera aleatoria a los dilignoles y finalmente forman la lignina después de pasos sucesivos de reoxidación.

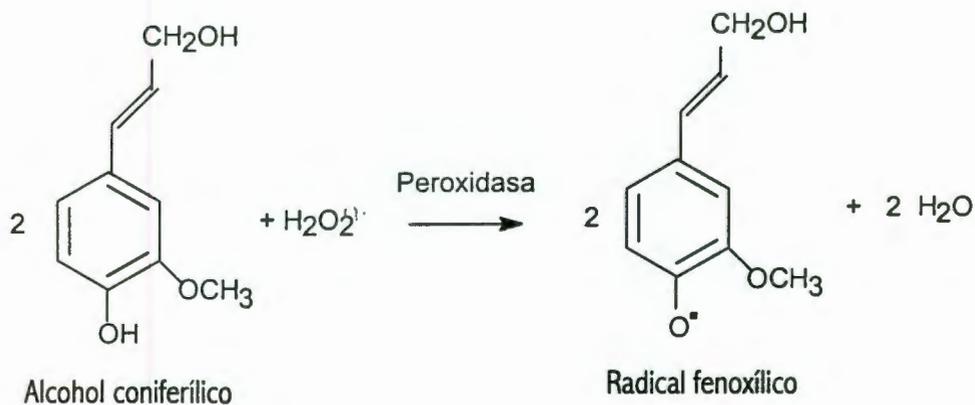
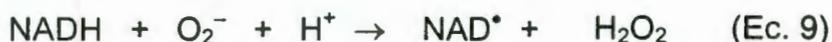


Figura 2.3. Formación del radical fenoxílico catalizado por peroxidasa.

Existen numerosos reportes que señalan el involucramiento de la peroxidasa en la biosíntesis de ligninas (Campa, 1991; Lagrimini, 1991; Lagrimini et al., 1993). Las dos reacciones involucradas en el proceso de lignificación son: la polimerización oxidante del alcohol coniferílico y la generación del peróxido de hidrógeno a expensas de la oxidación de NADH. La peroxidasa primero cataliza la oxidación del alcohol coniferílico para formar los radicales fenoxílico, los cuales

entonces se polimerizan de manera no enzimática para formar la lignina. Puede también ocurrir acoplamiento con otros fenoles y otros constituyentes de la pared celular, incluyendo hemicelulosas, para crear una red tridimensional de ligninas.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  requerido para la lignificación es suministrado por una reacción dependiente de NAD(P)H. El oxígeno es reducido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  a expensas de NAD(P)H por una peroxidasa catiónica unida a la pared celular. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  requerido para la iniciación del ciclo peroxidativo en la oxidación de NADH catalizada por peroxidasa (Ec. 1, 4 y 5) puede ser suministrado por el rompimiento no enzimático de NADH (Ec. 6), generando  $\text{O}_2^-$  que puede dismutar para formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ec. 7).



Las ecuaciones 8 y 9 constituyen una reacción en cadena que consume  $\text{O}_2^-$ . La ecuación 9 ha mostrado ser la responsable para la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La oxidación de NADH es acelerada por  $\text{Mn}^{2+}$  y monofenoles, especialmente el alcohol coniferílico y es inhibida por las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. En ausencia de compuestos fenólicos adicionados y  $\text{Mn}^{2+}$ , la oxidación de NADH solo ocurre a pH ácido (Campa, 1991).

#### 2.4.4. Formación de las macromoléculas de ligninas

La formación de los enlaces entre las ligninas es el resultado de los acoplamiento oxidativos entre un monolignol y el oligómero/polímero en crecimiento. El acoplamiento oxidativo entre dos monómeros puede producir

diferentes formas del dímero (Figura 2.4). En las ligninas silvestres, las uniones 8-O-4 son las más abundantes, mientras que para las ligninas formadas *in vitro*, mezclando alcohol coníferico, peróxido de hidrógeno y peroxidasa, se obtienen porcentajes más altos de las uniones 8-8- y 8-5- (Nimz y Ludemann, 1976; Terashima et al., 1996).

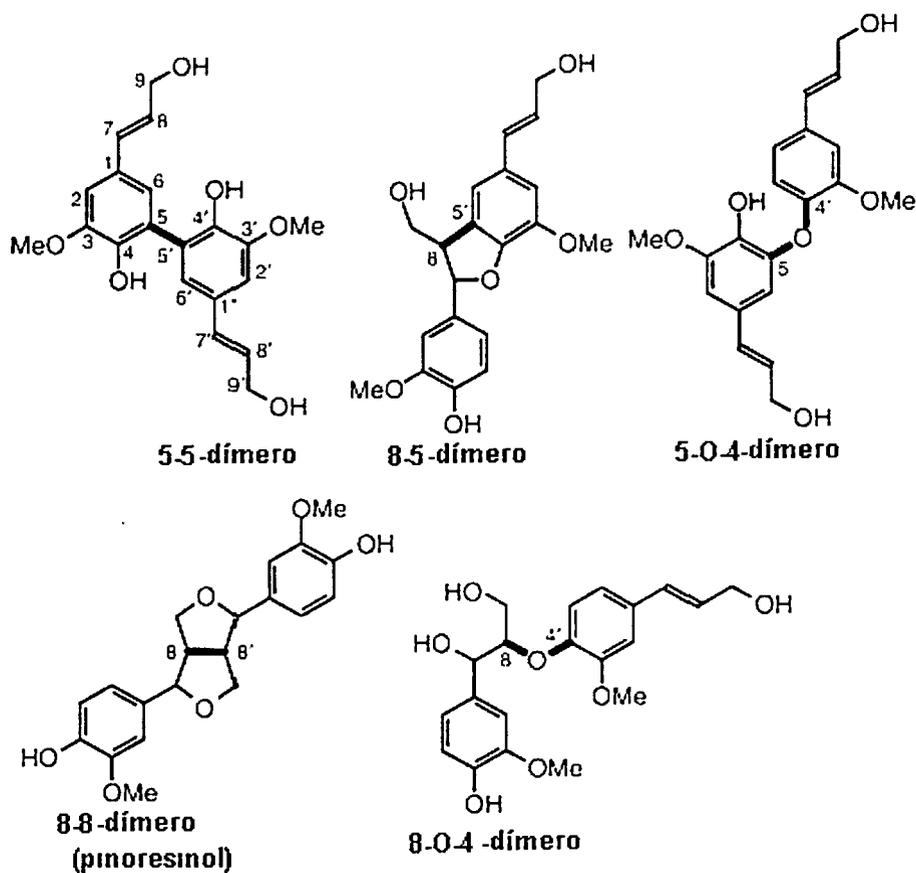


Figura 2.4. Formación de dímeros de monolignoles (Adaptado de Hatfield y Vermerris, 2001).

Hatfield y Vermerris (2001) propusieron dos modelos del acoplamiento de radicales para producir una molécula funcional de lignina: el modelo del acoplamiento aleatorio y el modelo de la proteína dirigente.

En el modelo de acoplamiento aleatorio, la formación de los radicales del monolignol se da por la interacción de éste con la enzima peroxidasa y el peróxido de hidrógeno. El radical formado se difunde al polímero de la lignina y puede experimentar una de dos posibles reacciones:

1) Si el polímero de la lignina está en un estado de oxidación basal (no radical); el estado de oxidación más alto del monolignol puede ser transferido a la molécula de la lignina, retornando al monolignol a su estado original; o

2) Si el polímero de la lignina está a un estado de oxidación más alto, el monolignol radical puede experimentar una reacción de acoplamiento oxidativo para formar un enlace covalente. La preferencia de acoplamiento es en la posición 8- (Figura 2.5). De acuerdo a este modelo, el tipo y la cantidad de monolignoles en el sitio de la lignificación controla la formación de las ligninas.

En el modelo de la proteína dirigente, la formación del enlace para producir un polímero de lignina está bajo estricto control de proteínas dirigentes. Sólo una de las proteínas ha sido caracterizada suficientemente para revelar que su actividad produce preferencialmente un dímero de alcohol coniferílico unido por un enlace 8-8- (pinorresinol); sin embargo, de acuerdo a este modelo, se requieren al menos 50 diferentes proteínas ya que cada enlace formado entre dos monolignoles o entre un monolignol y un polímero de lignina en crecimiento debe ser catalizado por una proteína dirigente específica (Figura 2.6).

Para ambos modelos se requiere de más investigación. Sin embargo, da idea de la complejidad del proceso de síntesis de la lignina.

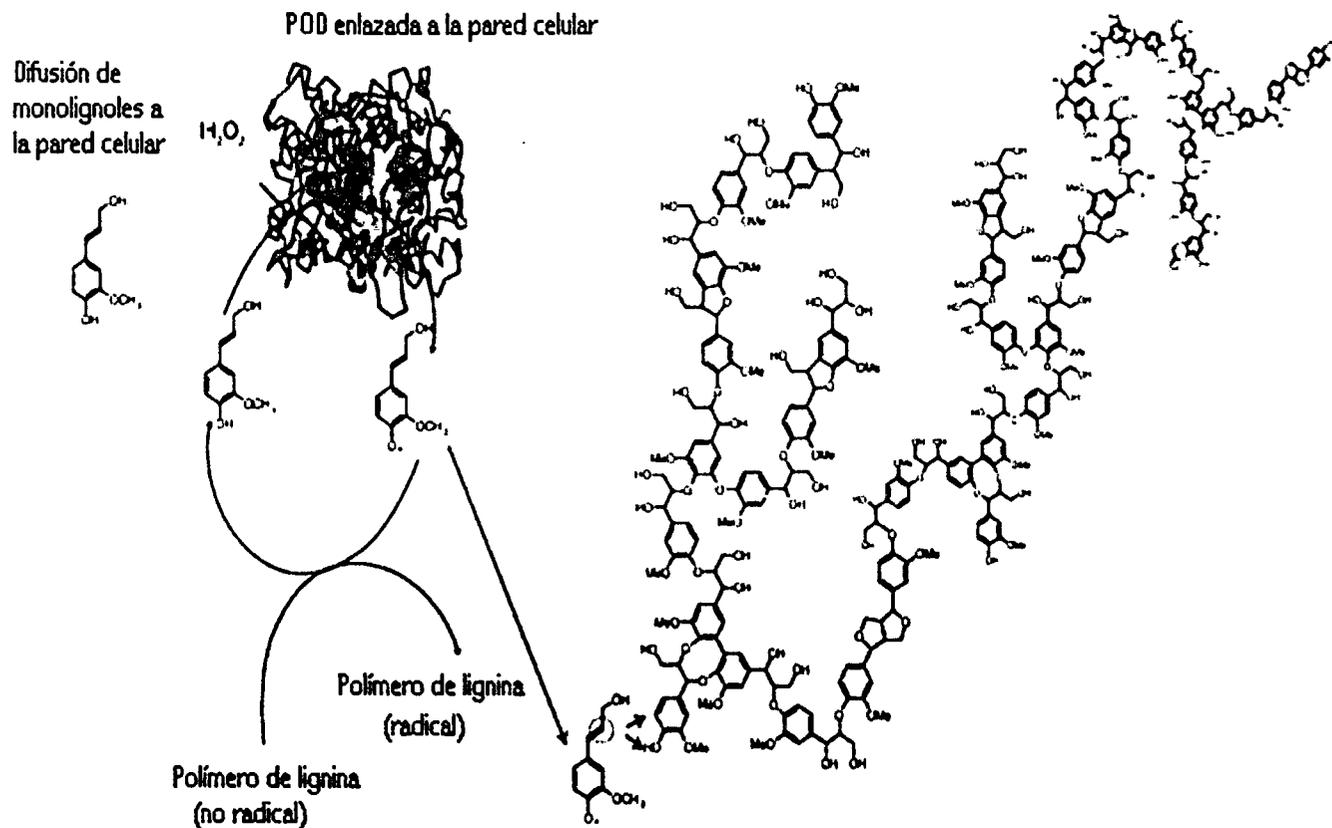


Figura 2.5. Representación esquemática de la formación de ligninas de acuerdo al modelo aleatorio (Adaptado de Hatfield y Vermerris, 2001).

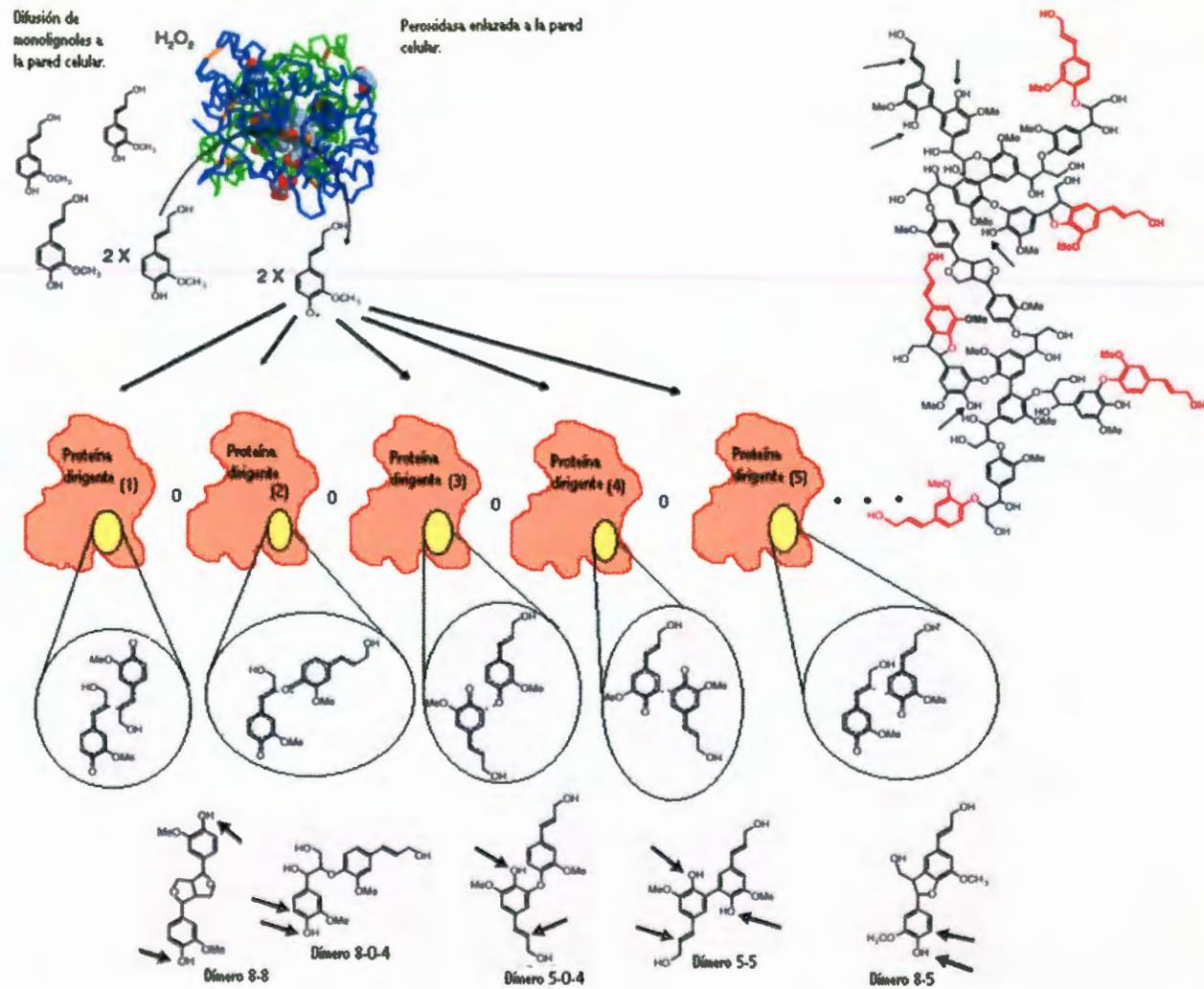


Figura 2.6. Representación esquemática de la formación de ligninas de acuerdo al modelo de la proteína dirigente (Adaptado de Hatfield y Vermeris, 2001).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La jícama es un producto originario de México y ha sido consumido por sus habitantes desde antes de la conquista. No obstante, hasta la fecha su utilización ha sido como producto fresco y las posibilidades de su uso en productos con valor agregado no han sido exploradas suficientemente a pesar de las características nutricias que ésta tiene. Los productos mínimamente procesados están cobrando una alta importancia en la comercialización de productos hortofrutícolas en estado fresco y esta tecnología es altamente viable para ser aplicada en esta raíz. Sin embargo, uno de los principales problemas que tienen estos productos, es el oscurecimiento enzimático que presenta durante su almacenamiento, por lo que se requiere de identificar el mecanismo de este oscurecimiento para poder desarrollar las mejores estrategias de control.

La evidencia científica actual se enfoca en que el proceso de oscurecimiento es generado por la acción de la enzima polifenol oxidasa que actúa sobre los compuestos fenólicos liberados por efecto del daño mecánico infringido a los productos durante su preparación. No obstante, existen también evidencias de que este fenómeno no se presenta en todos los casos, por lo que las correlaciones entre los factores involucrados no demuestran que el proceso se ajuste al esquema previamente establecido.

Por ello, es importante estudiar y proponer mecanismos alternos por los cuales el proceso de oscurecimiento se esté llevando a cabo. El conocimiento generado permitirá mejorar el estado actual del conocimiento de las reacciones de oscurecimiento enzimático con lo que se tendrían mayores herramientas para controlar el proceso en el campo de la tecnología de productos frescos.

Los resultados de la investigación serán de gran importancia a nivel de la ciencia de los alimentos, así como desde el punto de vista tecnológico para todas aquellas empresas productoras de jícama del país y también para aquellas empresas que se dedican a la exportación de hortalizas mínimamente procesadas.

## 4. HIPÓTESIS

El desarrollo del oscurecimiento en productos mínimamente procesados, incluidas las piezas de jícama, se presenta como resultado de la respuesta controlada del tejido para la reparación del daño mecánico infringido en los procesos de su preparación y no simplemente como el resultado de la libre acción de la enzima polifenol oxidasa sobre los compuestos fenólicos liberados.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Definir el mecanismo probable que genera el oscurecimiento enzimático en jícama mínimamente procesada.

### Objetivos específicos

#### ETAPA I

1. Relacionar los cambios de la actividad de la enzima polifenol oxidasa y el contenido de fenoles totales con los cambios de color en las piezas de jícama.
2. Definir los cambios en el perfil de los compuestos fenólicos y sus productos de oxidación durante el proceso de conservación del producto mínimamente procesado.
3. Analizar la afinidad de PPO por cada uno de los compuestos fenólicos solubles en etanol, presentes en la jícama.

#### ETAPA II

4. Evaluar el papel de la enzima peroxidasa en el proceso de oscurecimiento de las piezas de jícama.

5. Cuantificar los cambios del contenido de ligninas durante el almacenamiento de la jícama mínimamente procesada.
6. Identificar el tipo de monolignoles presentes en el tejido fresco y en las piezas de jícama durante su almacenamiento.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Estrategia experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en dos etapas. La Etapa 1 consistió en analizar el cambio de actividad de la enzima PPO durante el almacenamiento de los cilindros a 10 y 20°C, cuantificar el contenido de fenoles totales a través de un método espectrofotométrico y evaluar los cambios de color, así como también, separar los compuestos fenólicos por HPLC y utilizarlos como sustrato para la enzima PPO (Figura 6.1). Basándose en los resultados obtenidos en la primera etapa se planteó la etapa 2 en la cual se evaluó el papel de la enzima peroxidasa en el oscurecimiento de las piezas, el contenido total de ligninas y se caracterizó el tipo de ligninas en el tejido fresco y sus cambios durante el almacenamiento de los cilindros (Figura 6.2).

#### 6.1.1. Material biológico

Se utilizaron raíces de jícama (*P. erosus*) de la variedad Cristalina, la cual fue sembrada en el Campo Agrícola Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), ubicado en Celaya, Guanajuato, durante el mes de Febrero y cosechada en el mes de Septiembre en los ciclos de producción 2000 y 2001.

#### 6.1.2. Manejo de las raíces

En el laboratorio, se seleccionaron aquellas raíces que estuvieran libres de defectos visuales, como daño mecánico y pudriciones. Las raíces fueron lavadas y desinfectadas por inmersión en una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio a pH 7 durante 15 minutos; después de este tiempo, se dejaron secar por 20 minutos.

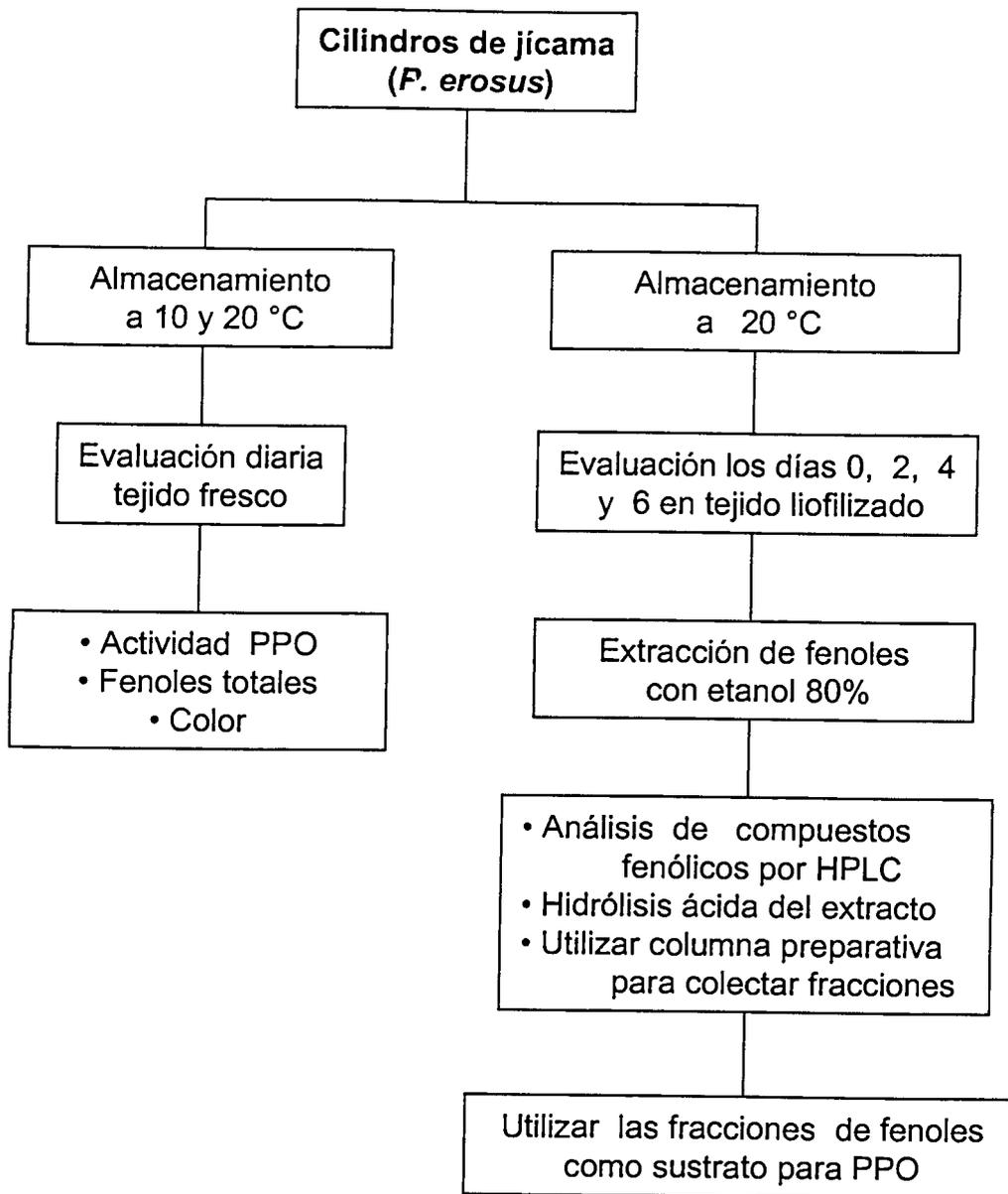


Figura 6.1. Metodología (Etapa 1).

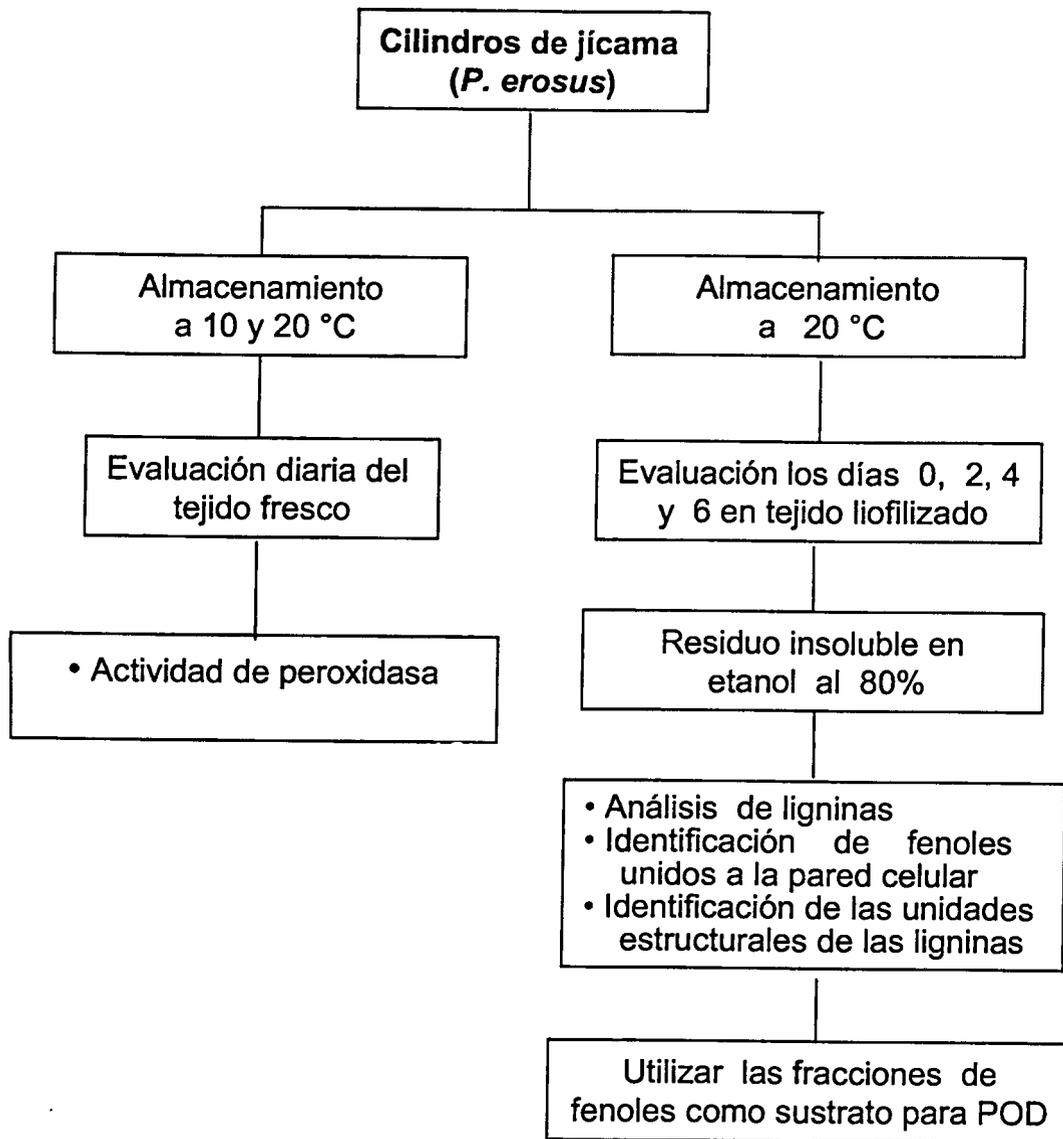


Figura 6.2. Metodología (Etapa 2).

### **6.1.3. Preparación de la jícama mínimamente procesada**

De cada raíz se cortaron las partes terminales, dejando una pieza ecuatorial de aproximadamente 5 cm de altura. Se obtuvieron cilindros de 1.8 cm de diámetro y 5 cm de largo, utilizando un sacabocados de acero inoxidable. Las piezas obtenidas se colocaron en una charola puesta sobre hielo para mantenerlas a baja temperatura y se cubrieron con manta de cielo húmeda para evitar su deshidratación.

Todo el material utilizado en la preparación de las muestras fue sanitizado con una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm de cloro libre.

### **6.1.4. Almacenamiento de los cilindros de jícama**

Conjuntos de seis cilindros de jícama fueron colocados en frascos de plástico de 250 ml los cuales fueron cubiertos con manta de cielo. Estos frascos, a su vez, fueron colocados en un recipiente de vidrio de aproximadamente 20 litros provisto de una tapa con dos tubos de vidrio. A través de uno de ellos, se hizo pasar una corriente de aire humidificado de 18 litros/hora; el otro tubo fue la salida de esa corriente de aire a fin de evitar la acumulación de CO<sub>2</sub> de la respiración del tejido que podría interferir con el desarrollo del oscurecimiento.

Distintos recipientes de vidrio fueron colocados en cámaras de refrigeración a temperaturas de 10 y 20°C. Se tomaron muestras del tejido externo (< 1 mm de grosor) y del tejido interno de los cilindros a diferentes tiempos; una parte se analizó como tejido fresco y otra parte fue congelada, liofilizada y almacenada a -20°C hasta su análisis.

## **6.2. Métodos empleados**

### **6.2.1. Determinación de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO)**

Se realizó tomando como referencia el método propuesto por Montgomery y Sgarbieri (1975), el cual se basa en la determinación espectrofotométrica del color que se genera a partir de la acción del extracto enzimático sobre un sustrato fenólico.

#### **6.2.1.1. Extracción de la enzima**

Se homogenizaron 0.6 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble con 5 g de tejido fresco y 20 ml de buffer de fosfato 50 mM a pH 7. El homogenizado se filtró a través de 2 capas de manta de cielo. El filtrado se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se consideró como el extracto de la enzima.

#### **6.2.1.2. Ensayo de actividad**

El ensayo de actividad se realizó con 2.85 ml de buffer de fosfatos 0.2 M (pH 7), 50 µl de catecol (60 mM) como sustrato y se inició la reacción agregando 100 µl del extracto de la enzima, la mezcla se mantuvo a 25°C dentro del espectrofotómetro a través de una celda Peltier. Se leyó el cambio de absorbancia, durante 3 minutos, a una longitud de onda de 420 nm, en un Espectrofotómetro Perkin Elmer (Mod. Lambda 40). El equipo mostró el cambio de absorbancia con el tiempo e indicó la pendiente de la recta obtenida. La actividad se reportó en unidades de actividad (UA), siendo una unidad de actividad de PPO, el cambio de una unidad de absorbancia por minuto.

Para el ensayo de la actividad de PPO con las fracciones de compuestos fenólicos separados por HPLC, se utilizaron 50 µl de las fracciones en lugar de catecol. La obtención de las fracciones se describe en el apartado 6.2.5.4.

### **6.2.1.3. Determinación de la temperatura óptima**

La temperatura óptima de actividad de PPO se determinó en un intervalo de 15 a 35°C. En tubos de ensaye de 10 ml se colocaron 2.850 ml de amortiguador de fosfatos pH 7 y 50  $\mu$ l de catecol 50 mM. Estos tubos fueron atemperados en un baño de agua a la temperatura requerida. Después de que los tubos alcanzaron la temperatura seleccionada, se adicionaron 100  $\mu$ l del extracto enzimático. La actividad de PPO fue determinada en la forma descrita anteriormente.

### **6.2.1.4. Determinación de pH óptimo**

El pH óptimo de actividad de PPO fue estudiado utilizando amortiguador de fosfatos 50 mM con valores de pH entre 5.8 a 8.1. Se usó catecol 1 mM en la mezcla de reacción como sustrato. La actividad enzimática fue determinada a la temperatura óptima obtenida anteriormente.

### **6.2.1.5. Determinación de $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$**

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) es la concentración del sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Puede obtenerse con facilidad una aproximación al valor de  $K_m$  a partir de una serie de experimentos en los que la velocidad inicial de la reacción se mide a diferentes concentraciones iniciales de sustrato con una concentración de enzima constante.

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para PPO fueron determinadas utilizando catecol como sustrato en concentraciones de 0 a 1.8 mM. El valor aproximado de  $K_m$  se obtuvo gráficamente al representar la velocidad inicial frente a la concentración inicial del sustrato.

## **6.2.2. Determinación de la actividad de peroxidasa (POD)**

### **6.2.2.1. Extracción de la enzima**

Se homogenizaron 0.6 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble con 5 g de tejido fresco y 20 ml de buffer de fosfato 50 mM a pH 7. El homogenizado se filtró a través de 2 capas de manta de cielo. El filtrado se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se consideró como el extracto de la enzima.

### **6.2.2.2. Ensayo de la actividad de POD durante el almacenamiento del tejido**

El ensayo de la actividad se midió tomando como referencia el método propuesto por Childs y Bardsley (1975). Se realizó con 1.34 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 6.0), 30  $\mu$ l de ABTS (2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico)) (50 mM), 50  $\mu$ l del extracto de la enzima y se inició la reacción con 80  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno (0.92 mM). Se leyó el cambio de absorbancia a 414 nm durante 3 minutos, utilizando un Espectrofotómetro Perkin Elmer (Mod. Lambda 40). Se obtuvieron las pendientes directamente del equipo. La actividad se reportó en unidades de actividad (UA), siendo una unidad de actividad de POD el cambio de una unidad de absorbancia por minuto. Para la determinación de actividad específica se analizó el contenido de proteína por el método de Bradford (1976).

### **6.2.2.3. Determinación de temperatura óptima**

La temperatura óptima de actividad de POD se determinó en un intervalo de 15 a 45°C. En tubos de ensayo de 10 ml se colocaron 1.34 ml de amortiguador de fosfatos pH 6 y 30  $\mu$ l de ABTS 50  $\mu$ M. Estos tubos fueron atemperados en un baño de agua a la temperatura requerida. Después de que los tubos alcanzaron la temperatura seleccionada, se adicionaron 50  $\mu$ l del extracto enzimático y 80  $\mu$ l de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.92mM). La actividad de POD fue determinada en la forma descrita anteriormente.

#### **6.2.2.4. Determinación de pH óptimo**

El pH óptimo de actividad de POD fue estudiado en un intervalo de pH de 3 a 7 utilizando amortiguador de ác. cítrico y fosfato de sodio para pH 3.5-5 y de fosfato de potasio para pH de 6-7. La actividad enzimática fue determinada a la temperatura óptima obtenida anteriormente.

#### **6.2.2.5. Determinación de Km y Vmáx**

Dado que la enzima peroxidasa utiliza dos sustratos primero se determinaron los parámetros cinéticos para la enzima en un intervalo de concentraciones de ABTS de 0 a 6 mM y posteriormente se mantuvo constante la concentración de ABTS en 1 mM y se varió la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0 a 0.10 mM.

#### **6.2.2.6. Contenido de proteína**

El análisis del contenido de proteína se realizó por el método de Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de color diferencial de un colorante en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. La absorbancia máxima de una solución ácida de azul de Coomassie G-250 cambia de 465 a 595 nm cuando el colorante se une a una proteína.

Para la determinación se mezclaron 100 µl del extracto enzimático y 5 ml del reactivo de Bradford, después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de albúmina bovina (Figura A1 del Apéndice).

### **6.2.2.7. Ensayo de la actividad de POD utilizando fenoles intermediarios en la biosíntesis de ligninas**

Para evaluar la actividad POD utilizando diferentes fenoles como sustrato, se siguió procedimiento descrito en el apartado 6.2.2.2. y solamente se sustituyó el ABTS por los compuestos fenólicos. Cada fenol se preparó a una concentración de 15 mM en metanol al 50% y a partir de esta solución se hicieron las diluciones necesarias. La actividad con el ácido *p*-cumárico fue medida con el cambio de absorbancia a 341 nm, con el ácido caféico a 404 nm, con el ác. ferúlico a 368 nm, con el coniferaldehído a 340 nm y con el alcohol coniferílico a 330 nm. En dichas longitudes de onda se observaron los mayores cambios de absorbancia ya sea por la desaparición del sustrato o por la aparición del producto.

También se utilizaron al ácido sinapílico, al sinapaldehído y al alcohol sinapílico como sustratos para esta enzima pero no se observaron cambios de absorbancia en la región uv-visible.

### **6.2.3. Análisis del contenido de fenoles totales**

Para la cuantificación global de los compuestos fenólicos se siguió el método descrito por Singleton y Rossi (1965). Este método se basa en que el reactivo de Folin-Ciocalteu oxida a los fenolatos presentes en la solución y al mismo tiempo se reduce parcialmente, lo cual genera un complejo de color azul. La intensidad del color es monitoreada espectrofotométricamente a 750 nm.

#### **6.2.3.1. Obtención del extracto**

En un homogenizador Ultra-Turrax T25, se homogenizaron 5 g de jícama con 20 ml de etanol al 80% durante 1 minuto. El homogenizado se filtró a través de 2 capas de manta de cielo y el filtrado fue centrifugado por 15 minutos a una velocidad de 10,000 rpm. El sobrenadante se utilizó para la determinación de fenoles totales.

### 6.2.3.2. Cuantificación

En un matraz volumétrico se colocaron 5 ml de H<sub>2</sub>O, un ml del extracto y 1 ml del reactivo Folin Ciocalteu (SIGMA®), después de 5-8 minutos se adicionaron 10 ml de carbonato de sodio (7%) y se aforó con agua a 25 ml. Después de una hora se leyó la absorbancia a 750 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico (Figura A2 del Apéndice).

### 6.2.4. Medición de color

El color se determinó usando un colorímetro Minolta CM 2002, con iluminante D65 y observador a 10°. Se registraron los valores de L\*, a\* y b\* con los cuales se calcularon la cromaticidad (C\*) y el ángulo de matiz (h°).

En el espacio de color CIE 1976 (L\*, a\*, b\*), o CIELAB, el coeficiente de luminosidad L, tiene un intervalo de negro = 0 a blanco = 100. Las coordenadas (a\*, b\*) localizan el color sobre una coordenada rectangular perpendicular a L\*. El color en el origen (a\* = 0, b\* = 0) es acromático (gris). Sobre el eje horizontal x, a\* positivo indica las tonalidades de rojo y a\* negativo, las tonalidades de verde. Sobre el eje vertical, b\* positivo indica amarillo y b\* negativo, azul (Minolta Corporation Manual, 1994).

McGuire (1992) reportó que puede obtenerse una forma más adecuada para medir el color, con el cálculo del ángulo de matiz (h°) y la cromaticidad (C\*), estos dos parámetros son índices análogos a la intensidad y saturación de color. Los parámetros son calculados a partir de a\* y b\*.

La cromaticidad  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  y representa la hipotenusa de un triángulo rectángulo creado por los puntos (0,0), (a\*, b\*) y (a\*, 0).

El ángulo de matiz puede ser definido como el ángulo que forma la hipotenusa de un triángulo rectángulo con el eje a\* y se define como  $h^\circ = \tan^{-1}$

( $b^*/a^*$ ). Para efecto de interpretación, el ángulo de matiz  $h^\circ$ , se mantiene positivo entre  $0^\circ$  y  $360^\circ$  ( $0^\circ$ = rojo,  $90^\circ$ = amarillo,  $180^\circ$ = verde y  $270^\circ$ = azul).

### **6.2.5. Separación e identificación de compuestos fenólicos solubles en etanol por HPLC**

La separación de los compuestos fenólicos solubles en etanol y su posterior análisis por HPLC fue realizada tomando como referencia las condiciones propuestas por Jaworski y Lee (1987).

#### **6.2.5.1. Obtención del extracto**

Se homogenizaron 5 gramos de tejido liofilizado con 200 gramos de etanol al 80%. El homogenizado se filtró a través de un papel whatman #1. El filtrado fue evaporado con vacío a una temperatura no mayor de  $45^\circ\text{C}$  hasta obtener un volumen de 20 ml. El concentrado se aforó a un volumen final de 25 ml con acetonitrilo al 20% en agua. Se dejó reposar por 8 horas y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se consideró como el extracto de fenoles.

#### **6.2.5.2. Purificación del extracto**

La presencia de elementos contaminantes en el extracto fenólico puede enmascarar o interferir con el análisis de los compuestos de interés. Con el uso de la extracción en fase sólida, como medio de purificación del extracto, se han obtenido cromatogramas más limpios en el análisis de los compuestos fenólicos (Lee et al., 1990).

Como medio de purificación del extracto fenólico, se utilizó un cartucho SepPak<sup>R</sup> Plus C18 (Waters), el cual se preacondicionó haciéndole pasar: 5 ml de acetato de etilo, 5 ml de metanol y 5 ml de HCl 0.01N. Después de preacondicionarlo, se hicieron pasar 5 ml del extracto de fenoles quedando estos

compuestos retenidos en el material de empaque. Los pigmentos y azúcares fueron removidos del cartucho con 3 ml de HCl (0.01 N). Posteriormente, el cartucho fue secado haciéndole pasar una corriente de nitrógeno durante 15 minutos.

Los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho fueron eluidos con 5 ml de acetonitrilo. Se evaporó el acetonitrilo y se redisolvió los fenoles en 1 ml de acetonitrilo al 50%. Esta solución fue filtrada a través de una membrana de 0.20  $\mu\text{m}$  antes de inyectar 20  $\mu\text{l}$  al equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

#### **6.2.5.3. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC**

Para la separación de los compuestos fenólicos solubles en etanol, se utilizó un equipo de HPLC de marca Waters modelo 510 equipado con una columna Nova-PaK C18 (3.9 x 300 mm). Para la separación, se utilizó un gradiente de concentración lineal de 10 a 100% del disolvente B en el disolvente A, durante 50 minutos; se mantuvo constante la concentración 100% de B durante 15 minutos y por último se retornó a las condiciones iniciales con un gradiente lineal en 15 minutos. Como disolvente A, se utilizó una solución de ácido fosfórico al 0.5% en agua y como disolvente B acetonitrilo al 50% en ác. fosfórico al 0.5%.

El flujo fue de 0.9 ml/min y el detector utilizado fue un arreglo de diodos, registrándose la absorbancia en un intervalo de 210 a 414 nm, con una amplitud de banda de 4 nm.

#### **6.2.5.4. Separación de compuestos fenólicos por HPLC utilizando una columna preparativa**

Para estudios de actividad enzimática utilizando como sustratos a las fracciones de compuestos fenólicos, éstos fueron separados por HPLC, utilizando una columna preparativa Nova-Pak C18 (7.8 x 300 mm), la cual permitió inyectar

un mayor volumen (400  $\mu$ l). El volumen total del extracto inyectado al equipo fue de 13.2 ml. La colección de las fracciones se hizo de manera manual a la salida de la tubería de la fase móvil. Las fracciones obtenidas se evaporaron a sequedad en un rotaevaporador y se resuspendieron en 1.5 ml de acetonitrilo al 50%.

Para la separación de los fenoles, se utilizó un gradiente de concentración lineal de 12 a 100% del disolvente B en el disolvente A, durante 35 minutos; se mantuvo constante la concentración 100% de B durante 10 minutos y por último se retornó a las condiciones iniciales con un gradiente lineal en 5 minutos. Como disolvente A, se utilizó una solución de ácido acético al 1% en agua y como disolvente B acetonitrilo al 50% en ác. acético al 1%. El flujo fue de 3.6 ml/minuto.

El ácido fosfórico utilizado en la columna analítica fue sustituido por el ácido acético cuando se utilizó la columna preparativa debido a la mayor volatilidad de este último, con lo cual fue más fácil su evaporación.

#### **6.2.5.5. Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos**

Para la identificación de los compuestos fenólicos, se inyectaron estándares comerciales de la marca SIGMA®, bajo las mismas condiciones de separación en el equipo de HPLC. Posteriormente, se comparó el tiempo de retención (TR) y el espectro de absorción de cada uno de ellos con el tiempo de retención y espectro de absorción de cada uno de los picos obtenidos en las muestras. Diez mg de cada estándar fueron disueltos en 2 ml de acetonitrilo al 50%, se filtraron a través de una membrana de filtración con tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m y 20  $\mu$ l fueron inyectados al equipo de HPLC.

Para los picos no identificados, la cuantificación de fenoles se realizó tomando como referencia el área del pico correspondiente al estándar de la vainillina.

trabajos reportados por Sun et al. (1996) y Andreasen et al. (2000), aunque con algunas modificaciones ya que estos autores lo realizaron en paja de trigo y en harina de centeno, respectivamente.

El residuo insoluble en etanol fue transferido cuantitativamente a frascos de vidrio y se le adicionaron 50 ml de NaOH 2N. Las muestras fueron calentadas durante 9 horas a 121°C, en una olla de presión. Después de enfriar, se centrifugó durante 10 minutos, a una velocidad de 10,000 rpm, para eliminar los sólidos aún remanentes. Se bajó el pH del sobrenadante a 2 agregando HCl 4N. Los compuestos fenólicos fueron extraídos 3 veces con 15 ml de acetato de etilo (grado HPLC). Se utilizó la centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos para separar la fase orgánica. Las fracciones de acetato de etilo se juntaron y se secaron con 4 g de sulfato de sodio anhidro. El sobrenadante se evaporó a sequedad en un rotaevaporador a 40°C. Los fenoles se resuspendieron en 1 ml de acetonitrilo al 50% y esta solución fue filtrada a través de una membrana de 0.2 µm antes de inyectar 50 µl al equipo de HPLC.

#### **6.2.8.4. Análisis de los monolignoles presentes en las ligninas**

Las ligninas son polímeros insolubles en todos los solventes, por lo que se requiere su degradación química para analizarlas. La oxidación con nitrobenzeno en medio alcalino es un método que se utiliza para romper las ligninas en unidades monoméricas, lo cual, permite analizar cualitativa y cuantitativamente las unidades que forman su estructura (Iiyama y Lam, 1990). La hidrólisis oxidativa de las macromoléculas de lignina, en medio básico conteniendo nitrobenzeno, degrada la cadena lateral alifática a varios grupos carbonilo y conserva el anillo aromático, dando como resultado la producción de aldehídos aromáticos simples como la vainillina, el siringaldehído y el 4-hidroxibenzaldehído (Galleti et al, 1989).

El análisis de las unidades estructurales de las ligninas (monolignoles) se realizó tomando como referencia el método reportado por Galleti et al. (1989). El material insoluble en etanol fue transferido cuantitativamente a frascos de vidrio, donde se le adicionaron 50 ml de NaOH 2N y 0.5 ml de nitrobenzeno. Las

muestras fueron calentadas durante 9 horas a 121°C, en una olla de presión. Después de enfriar, se centrifugó durante 10 minutos, a una velocidad de 10,000 rpm, para eliminar los sólidos aún remanentes. Al sobrenadante se le adicionaron 15 ml de diclorometano para eliminar el nitrobenzeno sin reaccionar. Se descartó la fase orgánica y a la fase acuosa se le agregó HCl 4N para llevar el pH a 2. Los compuestos fenólicos fueron extraídos 3 veces con 15 ml de acetato de etilo (grado HPLC). Las fracciones de acetato de etilo se juntaron y se les adicionaron 4 g de sulfato de sodio anhidro. Se separó el sobrenadante y se evaporó a sequedad en un rotaevaporador a 40°C. Los fenoles se resuspendieron en 1 ml de acetonitrilo al 50% y la solución fue filtrada a través de una membrana de 0.2 µm antes de inyectar 50 µl al equipo de HPLC. Los compuestos se identificaron utilizando un detector de arreglo de diodos.

#### **6.2.8.4.1. Identificación de los monolignoles**

Los compuestos 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído, separados por HPLC, fueron identificados por la comparación de su tiempo de retención y espectro uv, con los compuestos puros (estándares comerciales marca Sigma®). Para corroborar la identidad de estos compuestos, se analizaron por espectrometría de masas, para lo cual se colectaron aproximadamente 1 mg de cada analito.

El espectrómetro de masas utilizado fue de la marca JEOL modelo JMS-AX505HA (modo de impacto de electrones, 70 eV; temperatura inicial 94.5°C; temperatura de la fuente de iones 230°C).

#### **6.2.8.4.2. Purificación de los monolignoles**

La colección de las fracciones se llevó a cabo utilizando una columna preparativa con las condiciones descritas en el apartado 6.2.5.4. Dado que las fracciones colectadas mostraron estar contaminadas con otros pequeños picos,

éstas se concentraron y se inyectaron una vez más al equipo, pero las condiciones de separación fueron diferentes, como se describe a continuación.

Para separar al 4-hidroxibenzaldehído, se utilizó un gradiente de concentración lineal de 19 a 33% del disolvente B en el disolvente A durante 15 minutos y se retornó a las condiciones iniciales con un gradiente lineal en 3 minutos.

Para separar la vainillina, se utilizó un gradiente de concentración lineal de 20 a 40% del disolvente B en el disolvente A durante 20 minutos y se retornó a las condiciones iniciales con un gradiente lineal en 3 minutos.

Para separar al siringaldehído, se utilizó un gradiente de concentración lineal de 25 a 35% del disolvente B en el disolvente A durante 10 minutos y se retornó a las condiciones iniciales con un gradiente lineal en 3 minutos.

En todos los casos se utilizó como disolvente A una solución de ácido acético al 1% en agua y como disolvente B acetonitrilo al 50% en ác. acético al 1%. El flujo fue de 3.6 ml/minuto.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presentación de los resultados se hace de la manera en que los experimentos fueron mostrando evidencias de que el fenómeno de oscurecimiento no estaba siendo explicado por el concepto convencional y al mismo tiempo se aportaba información para sugerir un mecanismo alterno.

### 7.1. Evidencias del problema de oscurecimiento en jícama mínimamente procesada

La Figura 7.1 muestra en forma gráfica la presencia de oscurecimiento en los cilindros de jícama almacenados bajo distintas condiciones. Se puede observar que el oscurecimiento fue más pronunciado a medida que la temperatura fue mayor, lo cual indica los riesgos de pérdida de calidad del producto debido al abuso de temperatura durante el almacenamiento.

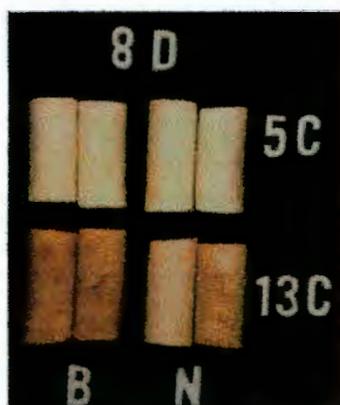


Figura 7.1. Oscurecimiento en cilindros de jícama almacenados a 5 y 13 °C, durante 8 días.

D: Días de almacenamiento, C: °C,  
B: Bajío, N: Nayarit.

Aquino-Bolaños et al. (2000) indicaron que el contenido de fenoles presentes en jícama mínimamente procesada durante el almacenamiento se incrementó y que dicho incremento estuvo relacionado con la temperatura; a mayor temperatura, mayor cantidad de fenoles, siendo mucho mayor a 10°C que a 7.5°C (Figura 7.2A).

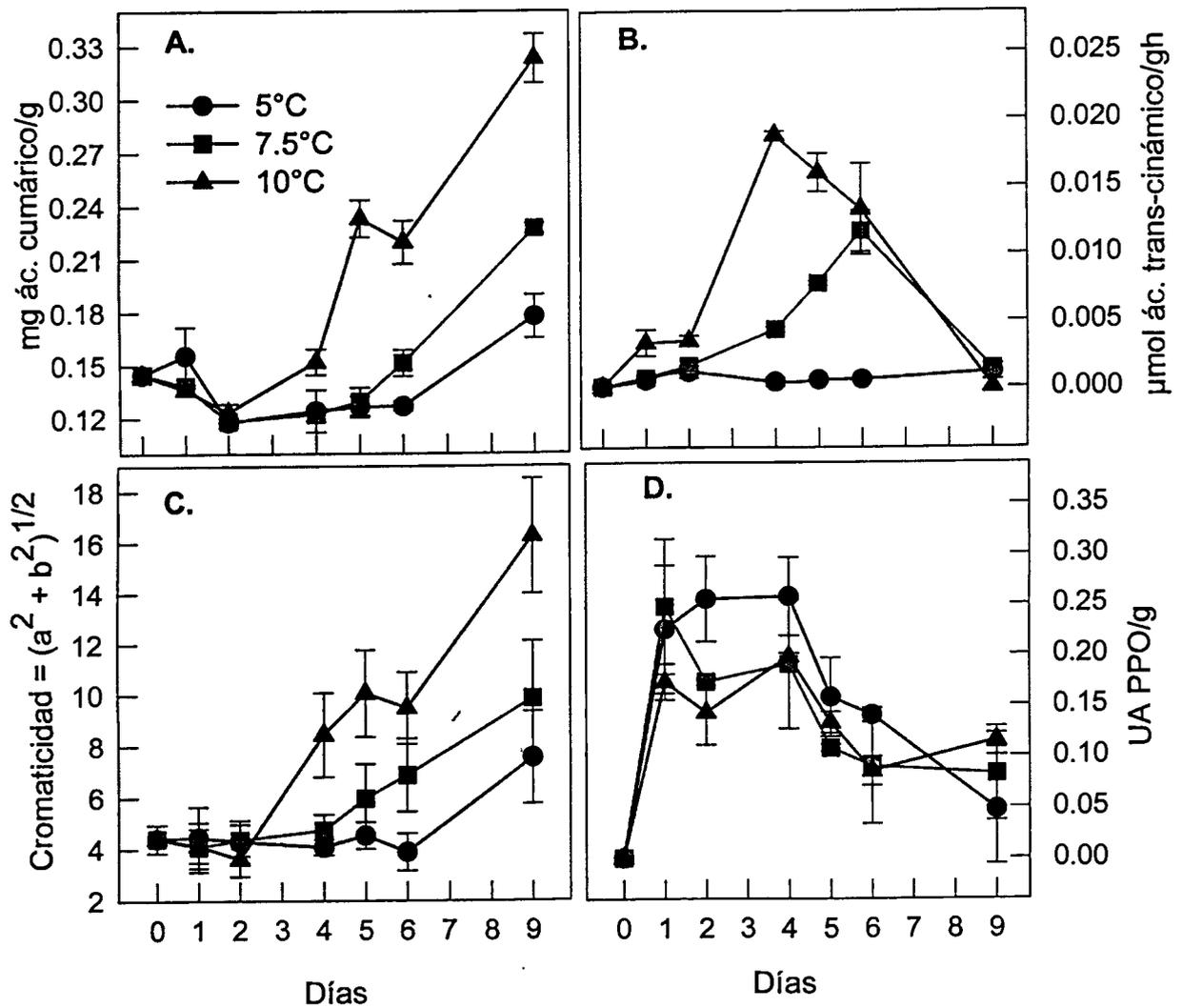


Figura 7.2. Contenido de fenoles totales (A), actividad de la enzima PAL (B), color (C) y actividad de la enzima PPO en discos de jícama del Bajío, almacenados durante 9 días.

En estos trabajos, se midió la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), una de las enzimas primarias en las rutas de síntesis de los fenoles en plantas. El incremento en la actividad de esta enzima se relacionó en forma directa con la cantidad de fenoles totales presentes (Figura 7.2B). Este aspecto demostró que durante el almacenamiento, hay síntesis de compuestos fenólicos y que, probablemente las rutas biosintéticas de estos compuestos se ponen en marcha como respuesta al daño.

Los cambios de color en el tejido se expresaron a través de la cromaticidad (valor  $C^*$ ) con respecto al tiempo; se observaron los mayores incrementos a partir del día 4 para los discos almacenados a  $10^{\circ}\text{C}$ ; para los discos almacenados a  $7.5^{\circ}\text{C}$  el incremento comenzó a partir del día cinco y para  $5^{\circ}\text{C}$  el cambio en la cromaticidad se hizo evidente hasta el día nueve (Figura 7.2C). Dado que las curvas de fenoles y de cromaticidad siguieron comportamientos similares, se hicieron regresiones lineales entre estos parámetros, encontrándose coeficientes de correlación de 0.68, 0.80 y 0.92 para las temperaturas de 5, 7.5 y  $10^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Estos resultados indicaron que el contenido de fenoles solubles en etanol explica en gran medida el oscurecimiento del tejido.

De acuerdo con la propuesta convencional, la acción de la PPO sobre los compuestos fenólicos genera el oscurecimiento del tejido. La Figura 7.2D muestra los cambios de actividad de esta enzima utilizando como sustrato el ácido caféico. La actividad se incrementó rápidamente en el primer día de almacenamiento, se mantuvo casi constante hasta el cuarto día y disminuyó hasta casi igualar los valores iniciales. Al comparar el comportamiento de la actividad de esta enzima con los valores de cromaticidad de las muestras se observa la falta de correlación entre la actividad de esta enzima con el proceso de oscurecimiento.

## **7.2. Cambios de color en tejido almacenado a $20^{\circ}\text{C}$**

Los parámetros que mejor describieron los cambios de color durante el almacenamiento fueron: la luminosidad, el ángulo de matiz y la cromaticidad

(Figura 7.3), resultados que concuerdan con lo reportado por Mercado-Silva y Cantwell (1998) para el caso del oscurecimiento en la jícama intacta afectada por el daño por frío.

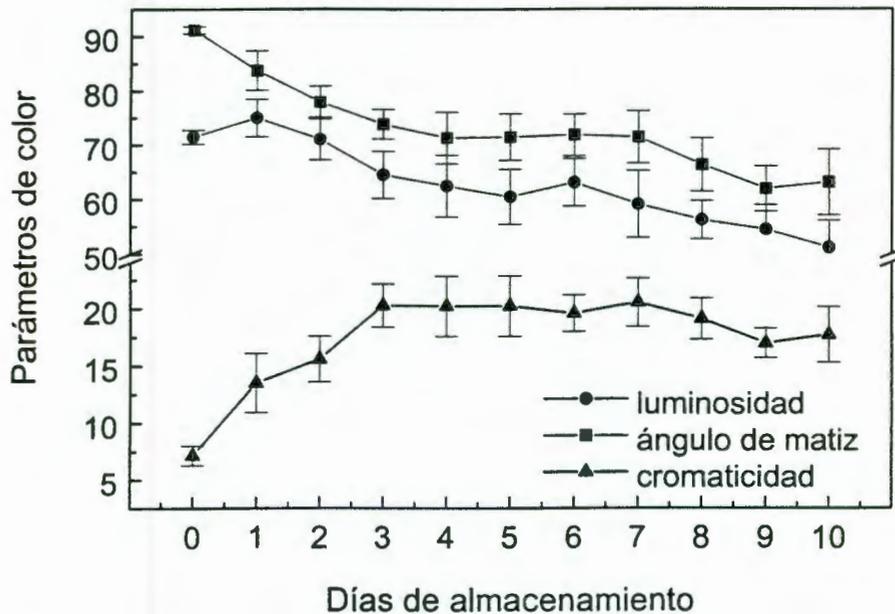


Figura 7.3. Parámetros de color en cilindros de jícama almacenados a 20°C.

Los valores de luminosidad cambiaron de 71.45 en el tiempo inicial hasta 51.15 en el día 10. El ángulo de matiz disminuyó rápidamente en los primeros 4 días, se mantuvo casi constante hasta el día 7 y disminuyó al final del almacenamiento indicando el cambio de color hacia tonalidades café-rojizo. La cromaticidad se incrementó desde 7.5 hasta 20.26 en los primeros 3 días; después de este tiempo se mantuvo casi constante. Estos datos indicaron que el oscurecimiento se generó principalmente en los primeros 4 días de almacenamiento a 20°C.

### **7.3. Estudios diferenciales de tejido interno y externo**

Dado que las muestras de jícama mostraron mayor oscurecimiento en el tejido externo respecto del tejido interno, un nuevo experimento fue realizado en el cual se determinaron los cambios en el contenido total de fenoles y la actividad de la enzima PPO en ambas zonas a 10 y 20°C, para obtener una respuesta más rápida.

#### **7.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos de PPO**

La temperatura y el pH óptimos varían ampliamente dependiendo de la fuente de extracción de la enzima y del sustrato (Vámos-Vigyázó, 1981), por ello se decidió evaluar en el extracto crudo los parámetros cinéticos más importantes de PPO.

##### **7.3.1.1. Temperatura óptima**

La Figura 7.4A muestra la actividad de la enzima PPO en un intervalo de temperatura de 15 a 35°C. Las temperaturas óptimas para obtener la máxima actividad de PPO fueron de 25 y 30°C (1.22 UA); mientras que a 15 y 20°C se observaron actividades bajas (0.76 y 0.95 UA, respectivamente). A temperaturas mayores de 30°, la actividad también fue menor.

Estos resultados coinciden con los obtenidos para PPO de albaricoque y la piel de manzana 'Monroe' donde las temperaturas óptimas fueron de 25 y 30°C, respectivamente (Vámos-Vigyázó, 1981; Zhou et al., 1993). Sin embargo, estos resultados difieren con los observados en PPO obtenida de manzana 'Amasya', en la cual se observó la máxima actividad a la temperatura de 15°C (Oktay et al., 1995). Por el contrario, la actividad máxima de PPO en plátano fue a 37°C (Vámos-Vigyázó, 1981).

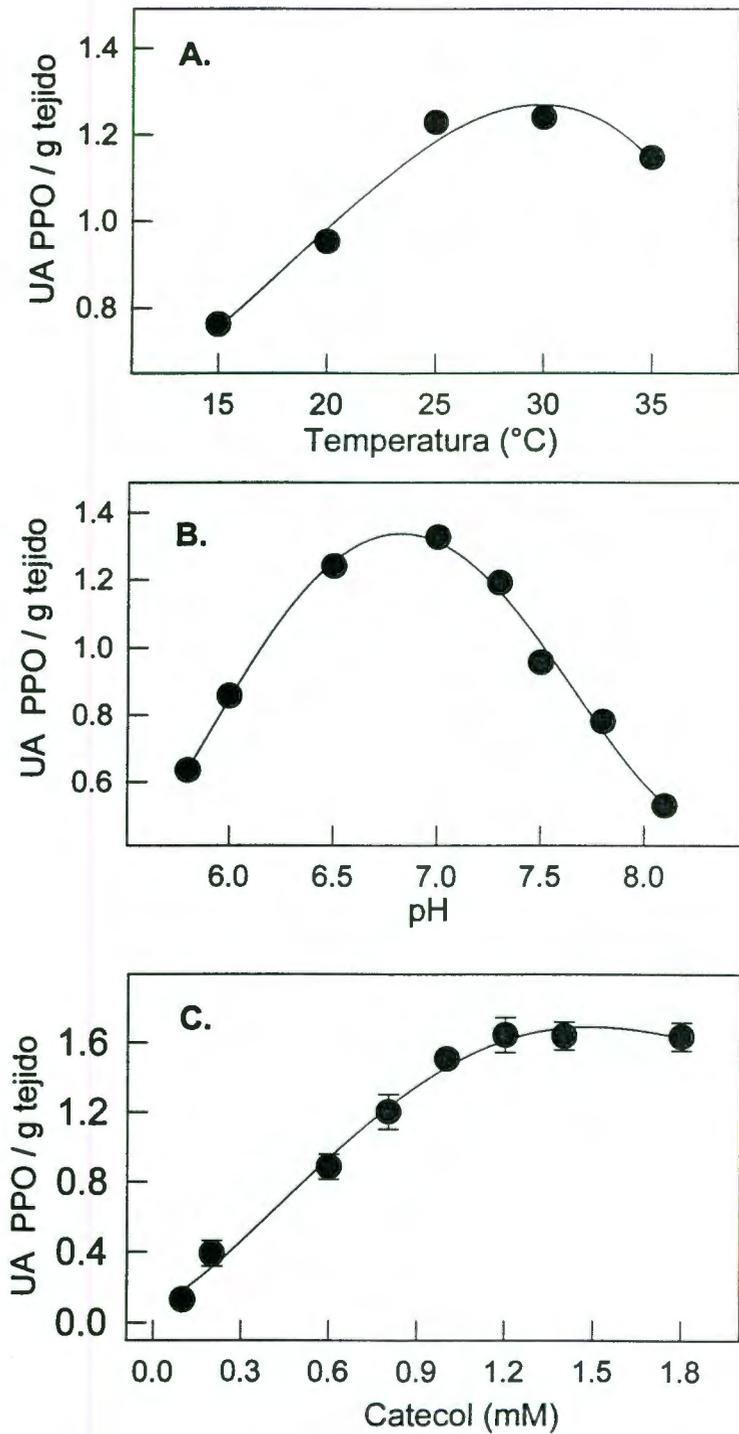


Figura 7.4. Efecto de la temperatura (A), pH (B) y concentración de catecol (C) sobre la actividad de la enzima PPO.

### 7.3.1.2. pH óptimo

La Figura 7.4B muestra que el pH óptimo de actividad de PPO fue de 7.0, lo cual corresponde con los resultados obtenidos para una amplia gama de productos entre los que se encuentran: la manzana, el durazno, la uva, el plátano, el mango (Vámos-Vigyázo, 1981) y los hongos del género *Portabella sp.* (Xiaodong y Flurkey, 1997).

Aunque generalmente el pH óptimo de actividad para esta enzima es cercano a la neutralidad hay algunas excepciones como es el caso de PPO extraída de cereza y de ciruela que presentó un pH óptimo de 4.0 y 4.25, respectivamente cuando se utilizó el catecol como sustrato (Vámos-Vigyázo, 1981).

### 7.3.1.3. Determinación de $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$

La Figura 7.4C muestra la gráfica del efecto de la concentración del catecol sobre la actividad de la enzima PPO. A partir de ella se obtuvieron los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , siendo estos de 0.53 mM y 1.64 UA PPO/ g de tejido fresco, respectivamente. Los valores de  $K_m$  recopilados por Vámos-Vigyázó (1981) para la enzima PPO extraída de la pera (8 mM), el tubérculo de papa (4.8 mM), la uva (3.06 mM), el durazno (0.12 M) y la pulpa de manzana (4.6 mM), utilizando el catecol como sustrato, fueron mayores que los obtenidos para PPO de jícama, lo cual indicó que PPO de jícama tiene mayor afinidad por el catecol que la PPO de los productos antes citados, esto corresponde con los estudios realizados por Meraz-Caro (2001), quien señaló al catecol como el mejor sustrato para evaluar la actividad de PPO, seguido del ácido caféico, la catequina, la epicatequina y el ácido gálico.

### 7.3.2. Actividad de PPO durante el almacenamiento de los cilindros

La actividad de PPO durante el almacenamiento de las piezas de jícama fue evaluada a la temperatura y pH óptimos utilizándose dos veces el valor de Km para asegurar la suficiencia del sustrato dentro del medio de reacción.

La Figura 7.5 muestra la actividad de PPO en los cilindros de jícama almacenados a 10 y 20°C. A 10°C, los niveles de actividad se mantuvieron bajos en el tejido interno y externo de las piezas. A 20°C se observó una clara diferencia entre el tejido externo e interno.

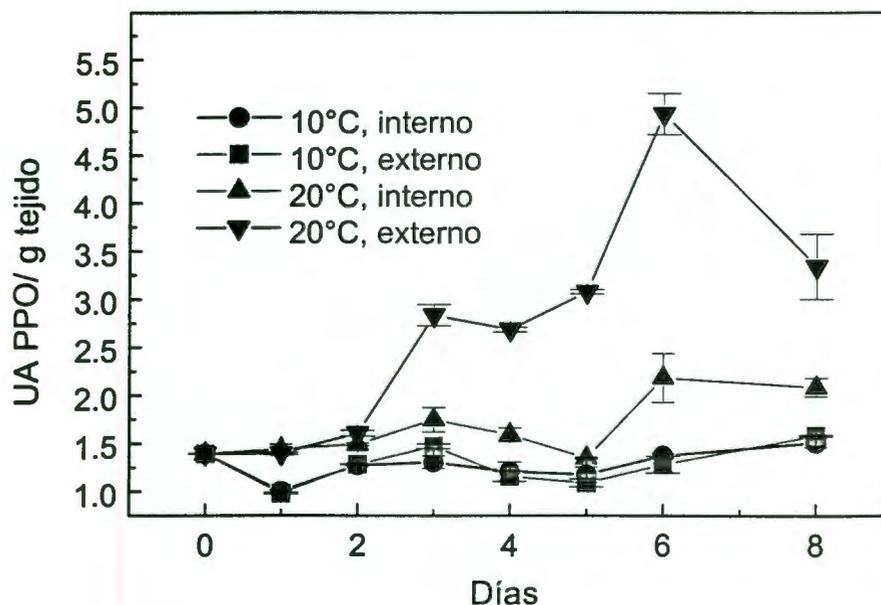


Figura 7.5. Cambios en la actividad de la enzima PPO en el tejido interno y externo de cilindros de jícama almacenados a 10 y 20°C.

En el tejido externo, la actividad se incrementó después del día 2 hasta alcanzar un máximo del día 6, después de este tiempo la actividad disminuyó. En el tejido interno la actividad se mantuvo casi constante y solo mostró un ligero incremento al final del almacenamiento. En el día 6, la actividad en el tejido externo fue de 4.93 UA/g de tejido fresco, equivalente a 2.6 veces mayor que en el

tejido interno. Estos resultados muestran que el incremento de actividad de PPO, como respuesta al daño mecánico, es dependiente de la temperatura y se estimula principalmente en la zona afectada. Estos resultados coinciden con los reportados en otros productos mínimamente procesados, en los que se señala que la respuesta se induce a partir de las células expuestas al corte, y se difunde a través del tejido adyacente (Cisneros-Zevallos et al., 1995 y Saltveit, 1998).

El comportamiento de la enzima PPO utilizando como sustrato el catecol pareció explicar mejor el oscurecimiento del tejido que la actividad de esta misma enzima utilizando al ácido caféico como sustrato. Estos resultados sugirieron la necesidad de separar los compuestos fenólicos presentes en la jícama y determinar cual de ellos era el mejor sustrato para la enzima y por lo tanto, el responsable de provocar el oscurecimiento del tejido.

### **7.3.3. Contenido de fenoles totales**

La Figura 7.6 muestra la variación del contenido de fenoles totales en el tejido interno y externo de los cilindros de jícama almacenados a 10 y 20°C. Los niveles iniciales del contenido de fenoles fueron mayores a los reportados por Paull y Chen (1988) en jícama intacta. En las piezas almacenadas a 10°C, este parámetro se mantuvo casi constante con una ligera disminución en el día 8; éste mismo comportamiento se observó en el tejido interno de las piezas a 20°C. Por el contrario, en el tejido externo de las piezas almacenadas a esta misma temperatura, se observó un incremento constante. En el día 8, el contenido de fenoles fue de 1.042 mg de ácido gálico/g de tejido fresco, lo que representó 2.8 veces más que el contenido inicial. Este resultado indicó que la síntesis de fenoles se da principalmente en la zona de daño del tejido, lo cual hace pensar que la capa de células inmediatamente por debajo de la zona de daño pone en funcionamiento la ruta de síntesis de fenoles en respuesta al estrés impuesto como se ha señalado en el camote, la yuca y el taro (Uritani, 1999).

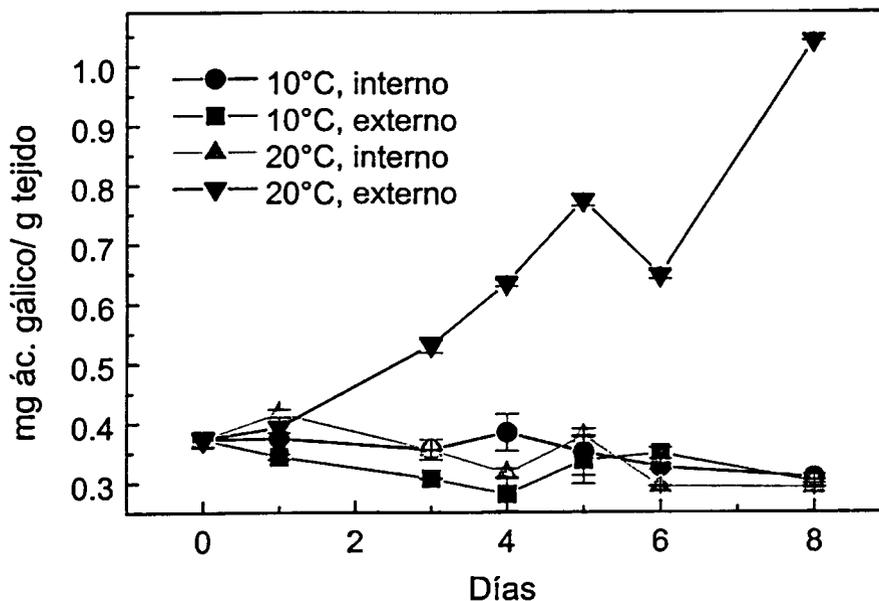


Figura 7.6. Variación del contenido total de fenoles en el tejido interno y externo de cilindros de jícama almacenados a 10 y 20°C.

También Tanaka y Uritani (1977) reportaron que el corte a la raíz de camote indujo como respuesta la producción intensa de polifenoles en las células adyacentes (1 mm de profundidad) y baja en las células distantes al tejido cortado. Un comportamiento similar fue observado en el desarrollo de las actividades de las enzimas involucradas en la biosíntesis de polifenoles (fenilalanina amonio liasa y ácido trans-cinámico 4-hidroxilasa) y las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa. Las diferencias de la producción de polifenoles fue asociada con la actividad de las enzimas involucradas en su biosíntesis.

#### 7.4. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC

La Figura 7.7 muestra los cromatogramas de compuestos fenólicos solubles en etanol, obtenidos del tejido externo de cilindros de jícama después de 0, 2 y 4 días de almacenamiento a 20°C.

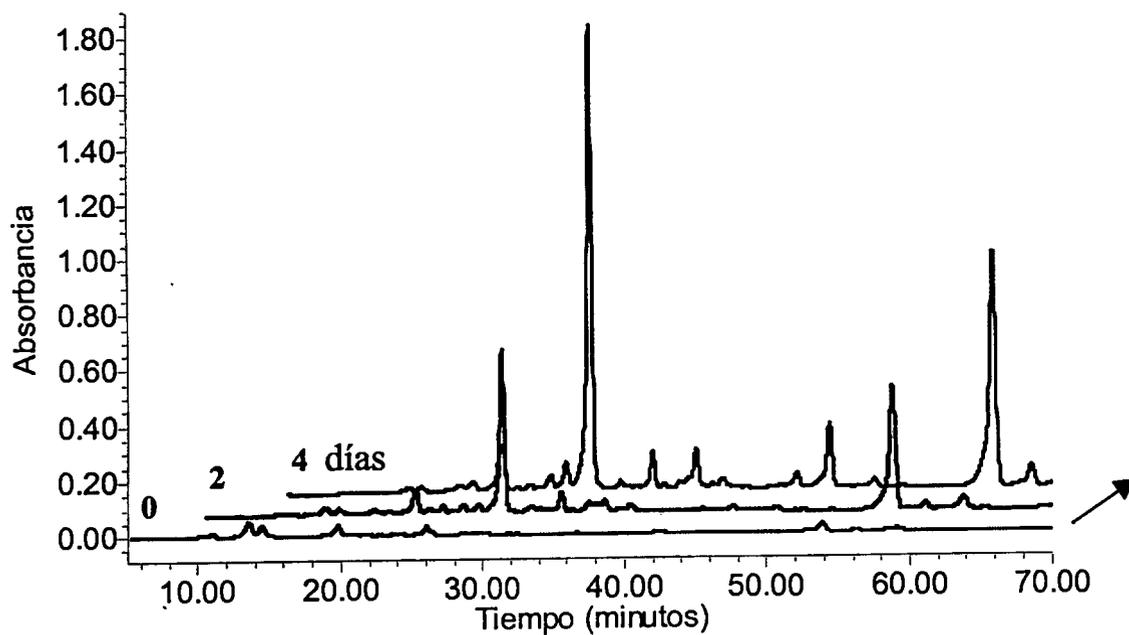


Figura 7.7. Cromatogramas de compuestos fenólicos solubles en etanol, extraídos del tejido externo de cilindros de jícama almacenados 0, 2 y 4 días a 20°C. Condiciones analíticas (ver apartado 6.2.5.3.)

En el tiempo inicial (0 días) la respuesta en unidades de absorbancia fue pequeña ( $<0.1$ ), pero ésta se incrementó con el tiempo de almacenamiento. Esta observación concuerda con los resultados del análisis del contenido total de fenoles (Figura 7.6).

Debido a la dificultad para identificar los compuestos separados, se utilizó como estándar de referencia a la vainillina para calcular en forma relativa el contenido del compuesto. En el Cuadro 7.1, se concentran los valores calculados de cada pico como  $\mu\text{g}$  de vainillina/g de tejido fresco.

Al inicio del almacenamiento, el equipo detectó 8 picos, siendo los más abundantes aquellos con tiempos de retención (TR) de 13.45 y 17.90 minutos. Después de 2 días de almacenamiento, el contenido total de fenoles fue mayor, debido al incremento en el área de los picos con TR de 20.01 y 54.51 minutos y a la aparición de dos picos con TR de 26.26 y 30.60 minutos. El tejido almacenado durante 4 días mostró un incremento generalizado en el área de los picos, destacando los de TR de 20.01, 26.26 y 54.51 que representaron el 75% del total de los compuestos fenólicos. Después de 4 días de almacenamiento el área de los picos se mantuvo casi constante.

Considerando que todos los picos que se observan en el cromatograma son compuestos fenólicos, los resultados obtenidos sugieren que durante el almacenamiento se incrementó el contenido de los fenoles ya existentes y también sugirió la síntesis de nuevos compuestos, debido al incremento de las áreas de picos preexistentes y la aparición de nuevos picos.

Cuadro 7.1. Contenido relativo de compuestos fenólicos calculados como  $\mu\text{g}$  de vainillina/g de tejido fresco.

| TR (min) | $\lambda$ (nm) | Tiempo de almacenamiento (días) |       |        |        |
|----------|----------------|---------------------------------|-------|--------|--------|
|          |                | 0                               | 2     | 4      | 6      |
| 11.08    | 215.6, 272.7   | 0.84                            | 0.35  | 0.83   | 0.80   |
| 13.45    | 215.6, 277.5   | 1.21                            | 2.23  | 3.98   | 3.64   |
| 14.40    | 215.6, 277.5   | 0.31                            | 1.41  | 1.81   | 2.31   |
| 17.90    | 258.4, 287.1   | 2.32                            | 1.86  | 2.99   | 2.56   |
| 20.01    | 248.9, 301h    | 0.60                            | 9.44  | 18.97  | 18.88  |
| 23.47    | 244.1          | ND                              | 2.46  | 4.87   | 4.35   |
| 24.55    | 248.9, 301h    | 0.60                            | 2.23  | 5.18   | 5.66   |
| 26.26    | 248.9, 301h    | ND                              | 32.16 | 82.61  | 82.30  |
| 30.60    | 258.4, 325.5   | ND                              | 4.47  | 6.81   | 0.34   |
| 33.66    | 282.3          | ND                              | 0.74  | 2.64   | 1.04   |
| 40.73    | 244.1, 287.1   | ND                              | 0.18  | 1.26   | 1.69   |
| 43.03    | 244.1, 325.5   | ND                              | 0.75  | 3.77   | 5.49   |
| 46.17    | 287.1          | ND                              | 0.52  | 0.72   | 0.38   |
| 54.51    | 244.1, 291.9   | 0.11                            | 11.40 | 21.71  | 12.54  |
| 57.19    | 263.2          | ND                              | 0.68  | 1.77   | 1.92   |
| 60.26    | 287.1          | 0.16                            | 0.55  | 4.63   | 10.72  |
| 63.41    | 296.7          | ND                              | ND    | 0.36   | 0.37   |
| 65.03    | 263.2          | ND                              | ND    | ND     | 0.22   |
| Suma     |                | 6.15                            | 71.43 | 164.91 | 155.22 |

TR: Tiempo de retención

$\lambda$ : Longitud de onda de máxima absorción

ND: No detectable

h: Hombro

#### 7.4.1. Identificación de los compuestos fenólicos

La espectroscopía de absorción en la región de ultravioleta-visible (uv-vis) es una herramienta que se utiliza en la identificación de compuestos fenólicos, así como también para la definición de su patrón de oxigenación (Markham, 1982).

Se trató de hacer una identificación previa de los compuestos separados por HPLC por comparación del tiempo de retención (TR) y de los espectros de absorción en la región ultravioleta en el intervalo de 210 a 420 nm con los correspondientes valores de 25 estándares puros que fueron analizados bajo las mismas condiciones. Dichos estándares corresponden a los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido caféico, ácido cumárico, los ácidos clorogénico e isoclorogénico, el ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido sinápico, catequina, epicatequina, naringina, rutina, floridizina, baicaleína, quercetina, los alcoholes coniferílico y sinapílico, coniferaldehído, sinapaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído.

Ninguno de los picos presentes en los cromatogramas de compuestos fenólicos solubles en etanol coincidió con el TR y espectro de alguno de los estándares. Aunque Uritani (1999) indicó que en tubérculos como la yuca y el taro, el daño mecánico indujo la síntesis de (+)-catequina y sus derivados, mientras que en camote se produjeron los ácidos clorogénico e isoclorogénico.

Dado que el objetivo del trabajo era identificar aquellos compuestos involucrados en el oscurecimiento, antes de continuar con los análisis de identificación de compuestos fenólicos utilizando la espectrometría de masas, nos interesó saber, cuales de los compuestos fenólicos separados eran buenos sustratos para la enzima PPO. Con eso, la explicación al problema de oscurecimiento podría ser parcialmente resuelta ya que el o los fenoles separados podrían ser identificados posteriormente.

#### 7.4.2. Actividad de PPO frente a los compuestos fenólicos separados por HPLC

Para la separación de compuestos fenólicos en cantidad suficiente para los análisis de actividad se efectuó una cromatografía preparativa en el equipo de HPLC inyectándose un total de 13.2 ml del extracto etanólico y colectándose 15 fracciones (Figura 7.8A).

Los sustratos fenólicos naturales más comunes en el oscurecimiento enzimático de frutas y hortalizas, catalizado por PPO, son las catequinas, los ésteres del ácido cinámico (como el ác. clorogénico y sus isómeros), 3,4 dihidroxifeniletanolamina y tirosina (Zawistowski et al., 1991). Sin embargo, algunas polifenoloxidasas utilizan otros sustratos; por ejemplo, la catecolasa de la uva actúa sobre los ácidos *p*-cumárico y cafeoiltartárico, mientras que PPO de manzana mostró mayor actividad con catecol (Dorantes-Alvarez y Chiralt, 2000). Aún cuando el catecol mostró ser un buen sustrato para PPO de jícama, ninguno de los sustratos citados estuvo presente en el extracto de fenoles de esta raíz.

Los resultados de la actividad de la enzima PPO, utilizando como sustratos las fracciones colectadas, se muestran en la Figura 7.8B y el cuadro 7.2. La enzima PPO produjo mayores cambios de absorbancia al utilizar como sustrato las fracciones 1, 3 y 14 con las que mostró 1.38, 1.31 y 1.07 unidades de actividad, respectivamente. Con las fracciones restantes se obtuvieron valores de actividad menores a la unidad. Comparando estos valores con los registrados con catecol como sustrato, éstos fueron mucho más bajos (4.2 veces menos para la fracción 1), dando evidencia que ninguna de las fracciones fue un buen sustrato para la enzima.

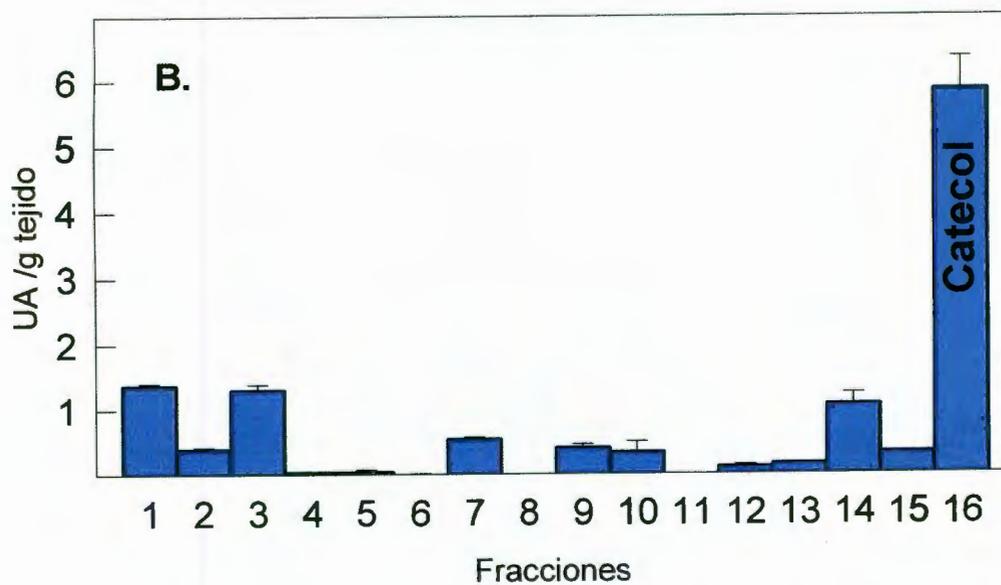
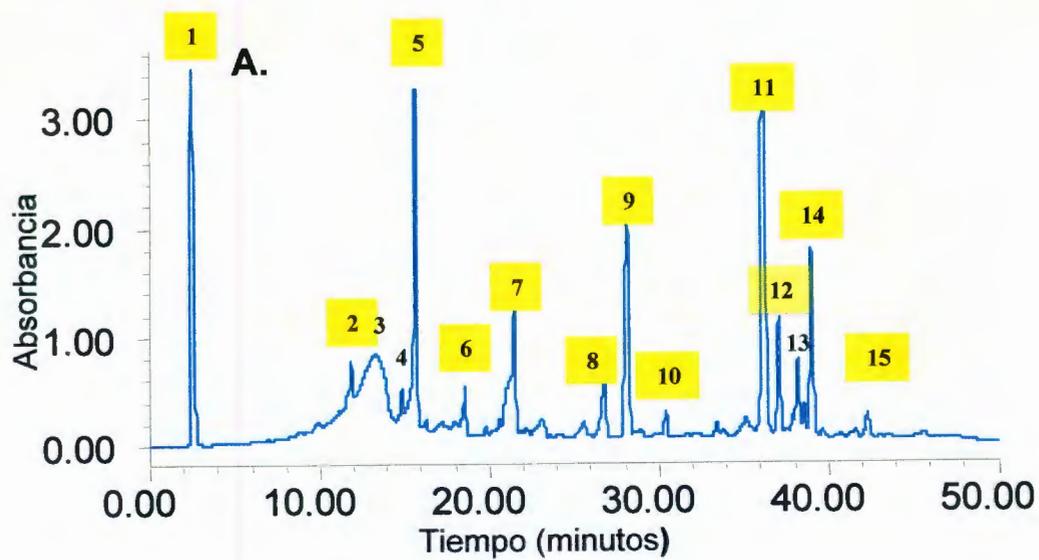


Figura 7.8. Fracciones de compuestos fenólicos colectadas (A) y utilizadas como sustrato para PPO (B).

Condiciones preparativas (ver apartado 6.2.5.4.)

Cuadro 7.2. Actividad de PPO utilizando como sustrato las fracciones de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico.

| <b>Fraccción</b> | <b>TR (minutos)</b> | <b>UA PPO/g tejido</b> | <b>DE</b> |
|------------------|---------------------|------------------------|-----------|
| 1                | 2.54                | 1.38                   | 0.04      |
| 2                | 11.82               | 0.40                   | 0.03      |
| 3                | 13.23               | 1.31                   | 0.09      |
| 4                | 14.81               | 0.04                   | 0.01      |
| 5                | 15.62               | 0.05                   | 0.04      |
| 6                | 18.48               | 0.02                   | 0.01      |
| 7                | 21.49               | 0.55                   | 0.03      |
| 8                | 26.79               | 0.01                   | 0.00      |
| 9                | 28.10               | 0.41                   | 0.06      |
| 10               | 30.26               | 0.34                   | 0.16      |
| 11               | 36.05               | 0.00                   | 0.00      |
| 12               | 36.87               | 0.11                   | 0.03      |
| 13               | 37.69               | 0.16                   | 0.01      |
| 14               | 38.75               | 1.07                   | 0.18      |
| 15               | 41.92               | 0.33                   | 0.00      |
| Catecol          |                     | 5.86                   | 0.50      |

TR: Tiempo de retención

UA: Unidades de actividad

DE: Desviación estándar

Estos resultados trajeron a discusión el papel de esta enzima durante el proceso de oscurecimiento. Es decir, la actividad de la enzima se incrementa pero los sustratos presentes en el tejido parecen ser utilizados en baja proporción para las reacciones de oxidación de esta enzima.

Los picos correspondientes a los tiempos de retención de 20.01 y 24.55 minutos presentaron el mismo espectro (cuadro 7.1), como si se tratara de compuestos parecidos. Después de 2 días de almacenamiento, apareció un nuevo pico con TR de 26.26 minutos que también presentó el mismo espectro; este último pico fue el de mayor abundancia y representó alrededor del 50% del total de los compuestos fenólicos para ese tiempo de almacenamiento.

Esto podría indicar que las distintas fracciones de compuestos fenólicos que se utilizaron como sustratos para PPO no sean compuestos simples sino mas bien polímeros; ya que las fracciones de los fenoles fueron obtenidas a partir de tejido almacenado durante 6 días.

Macheix et al. (1990) y Merken y Beecher (2000) indicaron que los compuestos fenólicos están unidos a otros fenoles o grupos para formar polímeros o glucósidos que bajo estrés de daño son liberados por la acción de glucosidasas que actúan sobre los glucosil fenoles para producir las agliconas correspondientes, las cuales son sustratos para la actividad de las fenolasas. Un ejemplo de esto es el  $\beta$ -glucósido encontrado en hojas de manzana, identificado como floridizina, que bajo el estrés de daño, es hidrolizado por una  $\beta$ -glucosidasa a la aglicona floretina, la cual es hidroxilada y oxidada por una fenolasa para producir 3-hidroxi floretina y la correspondiente quinona (Rhodes y Woollorton, 1978). Por ello, se planteó realizar una hidrólisis ácida del extracto etanólico con el fin de obtener las agliconas de los compuestos fenólicos.

### 7.4.3. Hidrólisis ácida del extracto etanólico

Con la hidrólisis del extracto etanólico (obtenido de cilindros de jícama con 6 días de almacenamiento), desaparecieron la mayoría de los picos del cromatograma de compuestos fenólicos sin hidrolizar y en su lugar aparecieron 5 picos importantes (Figura 7.9).

El Cuadro 7.3 muestra el contenido relativo de compuestos fenólicos, calculados como  $\mu\text{g}$  de vainillina/g de tejido fresco, en los picos de los cromatogramas obtenidos como producto de la hidrólisis ácida del extracto de los fenoles solubles en etanol.

Cuadro 7.3. Compuestos obtenidos como producto de la hidrólisis ácida del extracto etanólico (calculados como  $\mu\text{g}$  de vainillina/g de tejido fresco) .

| TR (min) | $\lambda$ máxima (nm) | $\mu\text{g}$ vainillina/g tejido |
|----------|-----------------------|-----------------------------------|
| 5.94     | 225.1, 282.3h         | 363.72                            |
| 8.79*    | 253.7                 | 6.41                              |
| 10.55    | 225.1, 282.3h         | 14.29                             |
| 18.96    | 229.9, 282.3h         | 55.56                             |
| 28.81    | 248.1, 301.4h         | 35.57                             |
|          |                       |                                   |
| Total    |                       | 475.55                            |

\* Este pico no absorbe a 280 nm por lo que no se ve en el cromatograma de la Figura 7.9B

h: hombro

El pico con TR de 5.94 fue el que presentó la mayor área. En cuanto a su identificación, al igual que los compuestos no hidrolizados, los espectros y TR no correspondieron con los estándares inyectados.

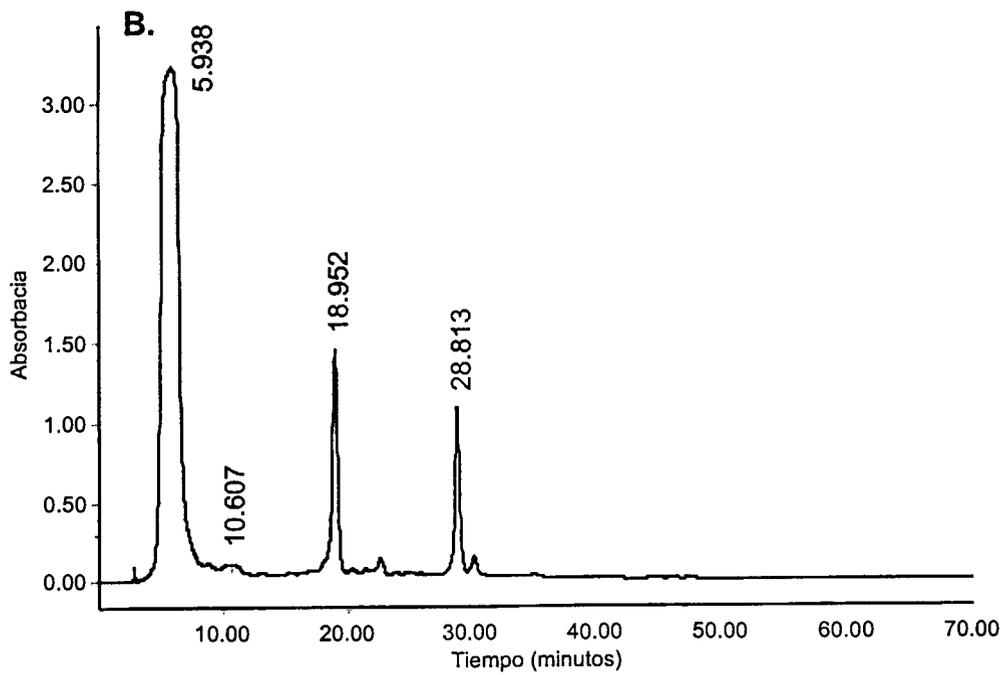
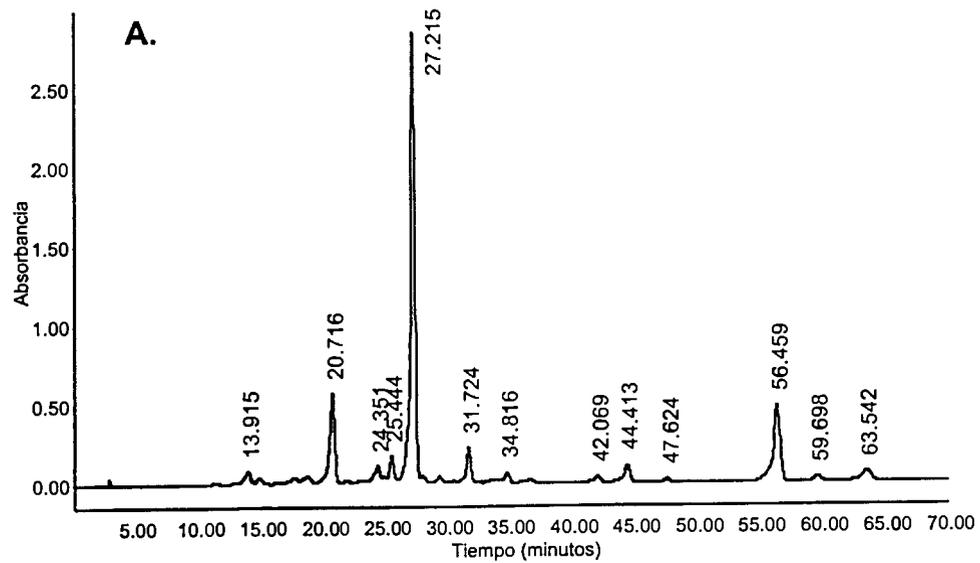


Figura 7.9. Cromatograma de compuestos fenólicos sin hidrolizar (A) e hidrolizados (B).

Los picos con tiempos de retención 5.94, 10.55 y 18.96 tienen espectros iguales lo que podría indicar la presencia de polímeros, lo cual hizo pensar en un metabolismo de compuestos fenólicos más complejo.

Como primera conclusión parcial se tiene que la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO), utilizando catecol como sustrato, se incrementó durante el almacenamiento del tejido, pero los compuestos fenólicos solubles en etanol presentes en la jícama no parecieron ser buenos sustratos para la enzima PPO. Estos resultado pusieron en duda si la enzima PPO es la principal responsable del oscurecimiento o es parte del fenómeno a través de otros mecanismos como reacciones acopladas.

Jiang y Miles (1993) reportaron que la oxidación de los compuestos fenólicos por PPO generó  $H_2O_2$ , la cantidad producida de este compuesto dependió de la estructura del fenol. Estos autores sugirieron que el  $H_2O_2$  producido podría ser utilizado por la enzima peroxidasa (POD) para oxidar una mayor cantidad de fenoles en una mezcla de reacción conteniendo fenol, PPO y POD.

En estudios más recientes Richard-Forget y Gaillard (1997) mostraron que la oxidación de los compuestos 4-metil catecol, ácido clorogénico y (-)-epicatequina catalizados por PPO fue más rápida cuando se adicionó POD al medio de reacción. El incremento de la velocidad de oxidación de la (-)-epicatequina, resultado de adicionar POD a PPO, fue completamente relacionado con la generación de  $H_2O_2$  durante la oxidación de (-)-epicatequina por PPO. Sin embargo, la cantidad de  $H_2O_2$  generado, no explicó el incremento en la velocidad de oxidación del ácido clorogénico y 4-metil catecol. En este trabajo se observó el uso de las quinonas por POD como sustrato peróxido, con lo cual quedó demostrada la participación de PPO y POD en el oscurecimiento enzimático.

El papel de enzima PPO en el oscurecimiento también podría ser a través de su participación en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, particularmente fenil propanoides e indirectamente estar involucrada en la formación de ligninas

(Robb, 1984). Sin embargo no se tienen resultados concluyentes que soporten esta teoría. Rhodes y Woollorton (1978) señalaron que la formación del ácido caféico a partir del ácido *p*-cumárico, en la ruta de síntesis de los fenil propanoides, está catalizado por la enzima *p*-cumarato 3-hidroxilasa, esta enzima es del tipo de las PPO.

La complejidad anotada para la explicación del fenómeno de oscurecimiento indujo a evaluar otros mecanismos que pudieran ser parte de este fenómeno. Uno de ellos fue el involucramiento de la enzima peroxidasa como parte de un mecanismo de reparación de daño.

## **7.5. Papel de la enzima peroxidasa (POD) en el oscurecimiento de las piezas de jícama**

### **7.5.1. Determinación de los parámetros cinéticos de POD**

Al igual que para PPO, también se caracterizaron las condiciones para evaluar la actividad de POD durante el almacenamiento de los cilindros.

#### **7.5.1.1. Temperatura óptima**

La actividad de POD se incrementó con la temperatura en un intervalo de 15 a 45° (Figura 7.10A). Cuando la temperatura fue mayor de 45° se observó una amplia variabilidad de la velocidad inicial de la actividad de la enzima. Este mismo comportamiento fue observado por Wang y Luh (1983) en la peroxidasa extraída de espárrago verde aunque a temperaturas mayores (>50°). La temperatura óptima para POD extraída de la papa estuvo en el intervalo de 40 y 60°C, mientras que en coliflor fue de 35 a 40°C (Bernards et al., 1999 y Vámos-Vigyázó, 1981). Para fines prácticos la actividad de POD en los ensayos se evaluó a 30°C.

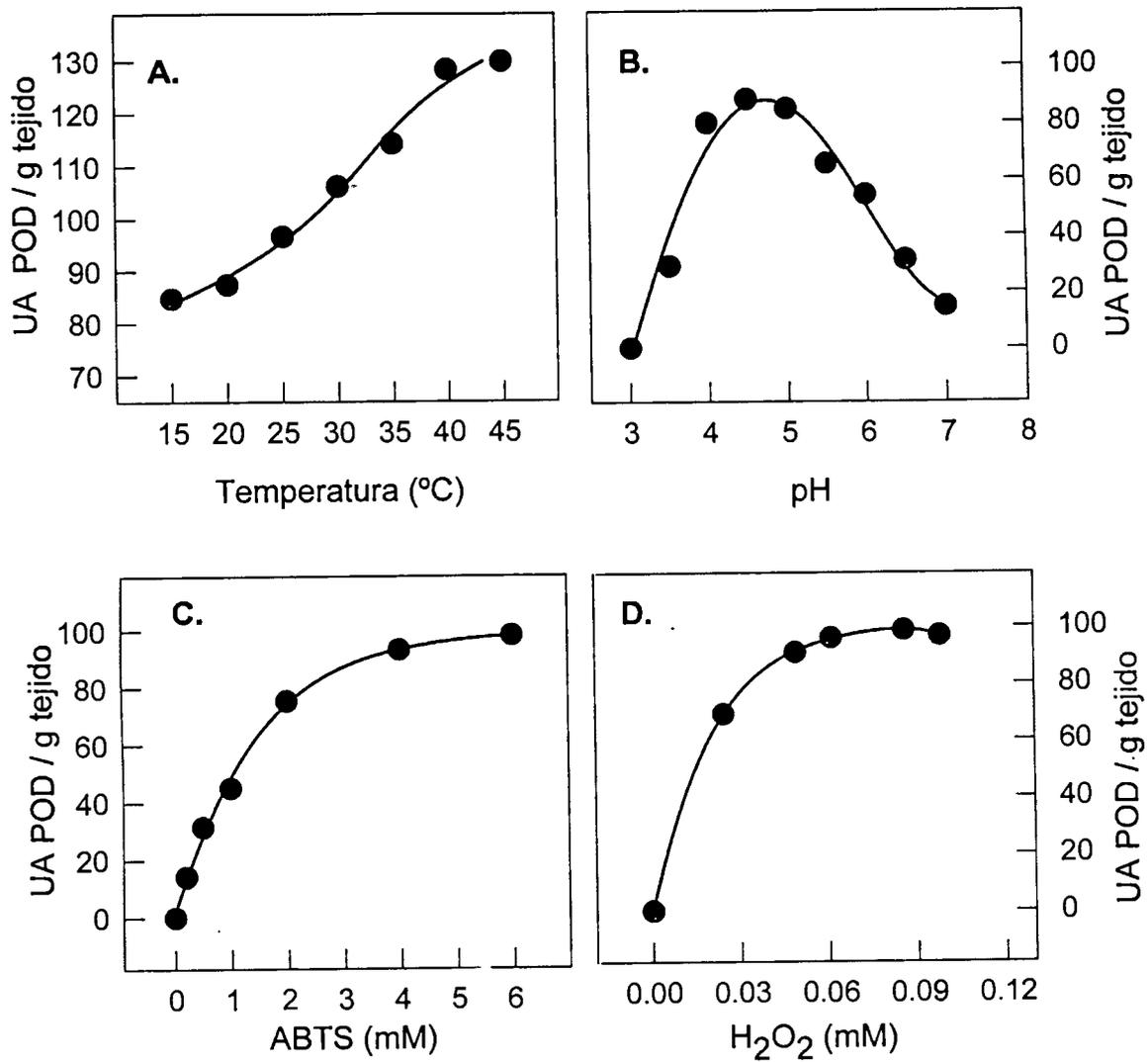


Figura 7.10. Efecto de la temperatura (A), pH (B), concentración de ABTS (C) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D) sobre la actividad de la enzima peroxidasa.

### 7.5.1.2. pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima POD fue evaluado en un intervalo de 3 a 7. La Figura 7.10B muestra un intervalo de pH óptimo entre 4 y 5. Estos resultados fueron similares a los encontrados en uva, plátano y piña en los que se reportan valores de pH de 4-5, 4.5-5 y 4.2, respectivamente (Vámos-Vigyázo, 1981). El pH óptimo para la peroxidasa extraída del endocarpio de durazno fue de 4-5 (Abeles y Biles, 1991). También se han reportado valores más altos como 6.5, 6.5 y 5.5 para el caso de camote, coliflor y soya, respectivamente (Hakim et al., 1998).

El pH óptimo de actividad de las enzima puede ser diferente en función del sustrato utilizado. Bernards et al. (1999) reportaron que el pH óptimo para POD de papa fue de 4.5 para los fenoles ácidos y 6.5 para los monolignoles intermediarios en la síntesis de ligninas; mientras que utilizando guayacol éste fue 5 y 6 (Kahn, 1981). Wang y Luh (1983) determinaron el pH óptimo de la enzima peroxidasa extraída de espárrago verde utilizando como sustrato donador de hidrógeno al guayacol, *o*-fenilendiamina y *o*-dianisidina y observaron que éste estuvo en un intervalo de 4.2-5.

### 7.5.1.3. Determinación de $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$

#### ***Sustrato donador de hidrógenos***

La enzima POD tiene una baja especificidad para el sustrato donador de hidrógeno. El guayacol es el sustrato más ampliamente utilizado, sin embargo, este compuesto también es sustrato para la enzima PPO, por lo tanto se planteó hacer el ensayo de POD con un sustrato específico para esta enzima como es el ABTS (2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico)). El efecto de la concertación del ABTS sobre la actividad de POD describe una curva característica de Michaelis-Menten (Figura 7.10C). A partir de esta gráfica se obtuvieron valores de  $K_m$  de 1 mM y  $V_{m\acute{a}x}$  de 98 unidades de POD/g de tejido

fresco. El valor de  $K_m$  es mayor que el reportado por Duarte-Vázquez et al. (2000) para dos fracciones ácidas de peroxidasa extraída de nabo. Esto puede ser debido a que en este trabajo se purificó la enzima y en nuestro caso se determinó en un extracto crudo. Sin embargo, es menor que el  $K_m$  reportado para POD de la col de Bruselas ( $K_m=0.2$ ) (Regalado-González et al., 1998).

### ***Sustrato peróxido***

La Figura 7.10D muestra el efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de POD, la máxima actividad (98 unidades de POD/g tejido) se obtuvo a una concentración de 0.060 mM. Este valor fue bastante más bajo que los reportados por Vamos-Vigyázó (1981) para la peroxidasa de la uva (63 mM), la papa (7.4 mM) y la raíz picante (3 mM), lo que indica que POD de jícama tiene alta afinidad por el peróxido. El valor de  $K_m$  (0.014 mM) obtenido es menor que el reportado para tres fracciones (C1, C2 y C3) de peroxidasas extraídas de la raíz de nabo (0.040, 0.245 y 0.850 mM) (Duarte-Vázquez, 2000).

### **7.5.2. Determinación de POD durante el almacenamiento**

Como un mecanismo de defensa de las plantas, el daño mecánico estimula la formación de una barrera natural que incluye la síntesis de ligninas y suberinas (Vance et al., 1980; Rhodes y Woollorton, 1978); la enzima peroxidasa está involucrada en el último paso de la polimerización de los alcoholes cinamílicos para formar las ligninas (Imberty et al., 1985).

El daño mecánico en el tejido de jícama, al obtener los cilindros, provocó un incremento en la actividad de peroxidasa (Figura 7.11A). A 20°C; se incrementó a partir del día 1 hasta obtener un máximo en el día 6 (450 UA/g tejido fresco). Durante el periodo de almaceñamiento, se encontró una actividad mayor en el tejido externo comparada con el interno, para el día 6 fue 1.4 veces mayor. A 10°C, solo hubo un ligero incremento de actividad en los días 5 y 6 y la actividad fue muy similar en el tejido interno y externo.

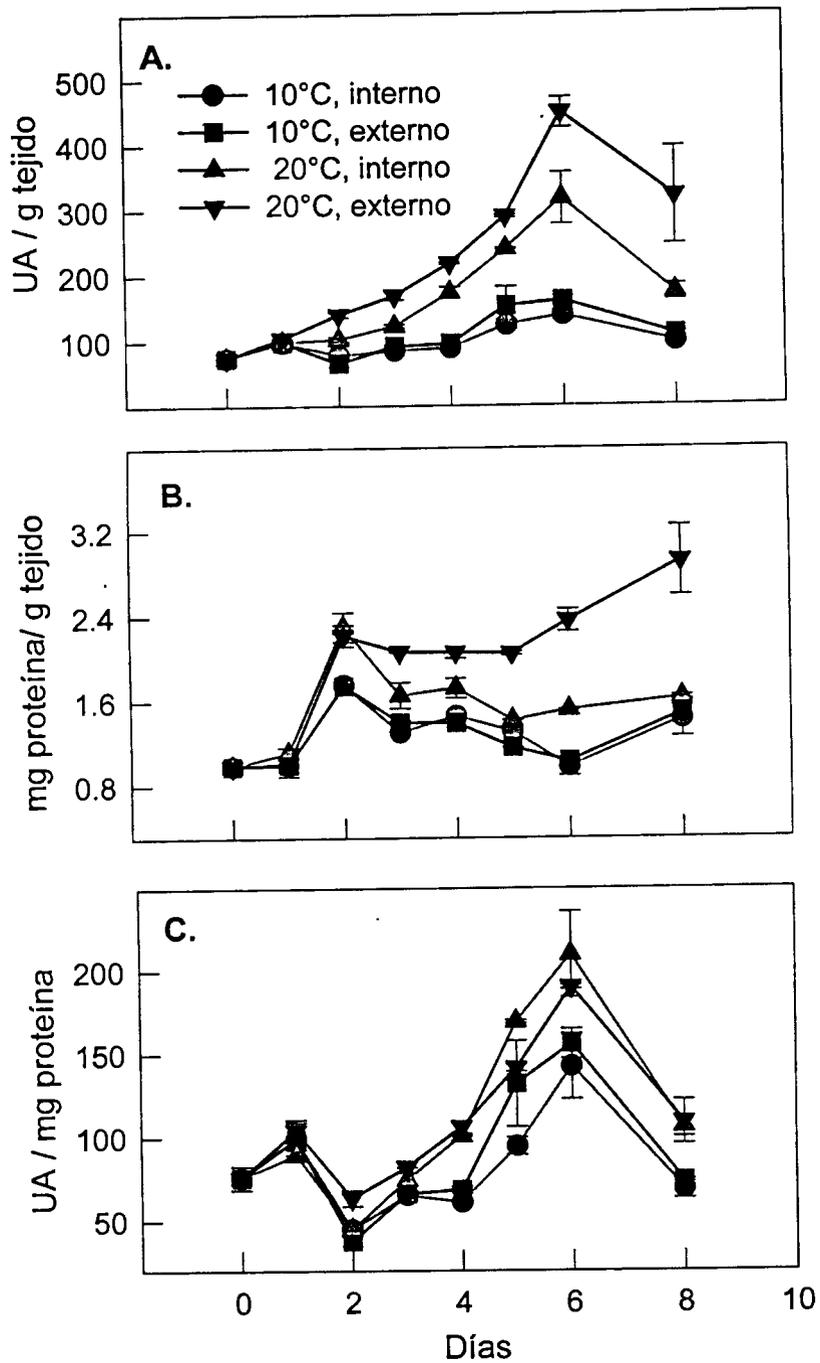


Figura 7.11. Cambios en la actividad de POD (A), contenido de proteína (B) y actividad específica de POD (C) durante el almacenamiento de cilindros a 10 y 20°C.

Estos resultados coinciden con los reportados por Thomas y Delincée (1979), quienes reportaron que en discos de papa, el daño mecánico provocó incremento de 7 a 21 veces la actividad de peroxidasa después de 14 días. Por su parte, Howard y Griffin (1993) describieron que las piezas de zanahoria también mostraron incremento en la actividad de peroxidasa y este aumento estuvo relacionado con el contenido de ligninas y con los cambios de color.

El incremento de la actividad de esta enzima en el tejido de jícama podría indicar que el oscurecimiento que presentan los cilindros de jícama pueda ser debido a la lignificación de la pared celular de las células cercanas a la zona de daño y en el tejido adyacente, como lo sugirieron Ke y Salveit (1989) en tejido de lechuga.

En productos como mangostan (Ketsa y Atantee, 1998), camote y taro (Uritani, 1999), se sugirió que el daño por impacto indujo la síntesis de una capa de ligninas en las células cercanas a la superficie, aunque en esos trabajos no se aportan datos suficientes que demuestren esta hipótesis. De igual forma, Lagrimini (1991) encontró que la actividad de peroxidasa, en tejido de plantas de tabaco, se correlacionó con el oscurecimiento inducido por el daño.

Si el incremento de la actividad de peroxidasa fue debido a la síntesis *de novo* de la enzima o a la activación de una forma previamente inactiva, el contenido de proteína debería de aumentar o mantenerse en el extracto enzimático. Los resultados del contenido de proteína se presentan en la Figura 7.11B. En el tejido externo a 20°C, el contenido de proteína se incrementó a partir del día 2, lo cual coincidió con el incremento de la actividad de POD, se mantuvo constante hasta el día 6 y después se incrementó nuevamente. Por el contrario, en el tejido interno, el contenido de proteína disminuyó ligeramente después del día 2; un comportamiento similar a este último mostró el tejido almacenado a 10°C.

Considerando el contenido de proteína, se calculó la actividad específica (Figura 7.11C). La actividad específica fue mayor en el día 6 y fue dependiente de la temperatura. A más alta temperatura, mayor actividad específica, aunque, las

diferencias de la actividad entre los tratamientos fueron menores, por lo que se podría suponer que el incremento en la actividad de la enzima es debido a la síntesis *de novo*. Un comportamiento similar se ha descrito en rebanadas de papa y camote en los que se ha señalado que el daño indujo un marcado incremento en la actividad de peroxidasa debido a la síntesis de isoenzimas (Thomas y Delincée, 1979).

## **7.6. Ensayos histoquímicos para la determinación de ligninas y suberinas**

La lignina está presente en las plantas vasculares y es principalmente sintetizada en células que llegan a formar parte del sistema de transporte. La suberina es sintetizada en células a partir de la endodermis y la exodermis de la raíz donde se fortalece la pared celular y contribuye al control del movimiento de agua (Quiroga et al., 2000). En las partes aéreas de la planta, se considera que la suberina es un componente del mecanismo de defensa de las plantas contra el ataque de patógenos y el daño mecánico. El último paso de la biosíntesis de ligninas y el dominio aromático de la suberina es la oxidación de los alcoholes cinamílicos; ésta oxidación está catalizada por las enzimas peroxidasa y/o lacasa (Whetten et al., 1998).

Se realizó una prueba histoquímica para evaluar la presencia de ligninas y/o suberinas en discos obtenidos de tejido fresco y en discos almacenados durante 6 días. La Figura 7.12A muestra que en el tejido fresco el fluoroglucinol coloreó de rojo (prueba positiva de la presencia de las ligninas) sólo los haces vasculares presentes en los discos de jícama. Estos resultados concuerdan con los reportados por Quiroga et al. (2000), quienes observaron que la síntesis de lignina en la raíz de tomate ocurrió en el protoxilema, cuyo destino final es llegar a ser parte del sistema vascular de la raíz, señalando además que la síntesis de ligninas se detuvo cuando los vasos del xilema fueron formados. Por el contrario, en los discos almacenados, la tinción fue homogénea sobre su superficie (Figura 7.12A), lo que sugirió la síntesis de ligninas en el tejido dañado durante el almacenamiento.

La Figura 7.12B muestra la tinción realizada para detectar la presencia de suberinas utilizando el reactivo de Sudan IV, el colorante se difundió ligeramente a través del tejido sin mostrar diferencias entre el tejido fresco y el tejido almacenado. Estos resultados demuestran que el daño mecánico que se produjo al obtener las piezas de jícama indujo principalmente la síntesis de ligninas. Es importante señalar que la presencia homogénea de ligninas en los discos almacenados durante 6 días estuvo localizada sólo en la superficie del tejido dañado (< 2 mm de profundidad), lo cual concuerda con el mayor contenido de fenoles totales, la mayor actividad de POD y el cambio de color en esta área.

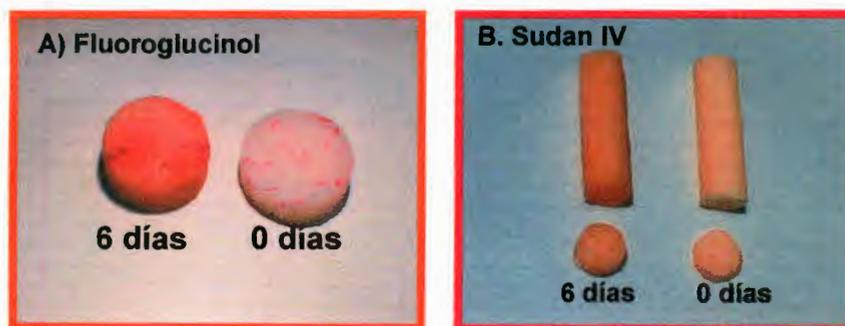


Figura 7.12. Prueba histoquímica con fluoroglucinol para detectar la presencia de ligninas (A) y sudan IV para suberinas (B).

### 7.7. Actividad de peroxidasa (POD) utilizando como sustratos fenoles intermediarios en la biosíntesis de ligninas

Si, como se ha sugerido, la enzima peroxidasa contribuye al oscurecimiento, ésta debe de ser capaz de polimerizar los compuestos fenólicos intermediarios en la síntesis de las ligninas. Por ello se midió la actividad de esta enzima utilizando diferentes compuestos intermediarios de la biosíntesis de la lignina.

La Figura 7.13 muestra el efecto de la concentración de diferentes sustratos sobre la actividad de la enzima peroxidasa. Los ácidos cumárico, ferúlico y caféico mostraron ser buenos sustratos para esta enzima, además también fue capaz de polimerizar al coniferaldehído y al alcohol coniferílico, compuestos que son intermediarios en la síntesis de las ligninas (Humphreys, 1999). Por el contrario, en presencia del ácido sinápico, el sinapaldehído y el alcohol sinapílico, la enzima no mostró actividad, lo que podría indicar que las ligninas presentes en el tejido de jícama son principalmente de tipo G.

Estos fenoles también fueron evaluados como sustratos de PPO observándose que solo el ác. caféico mostró ser utilizado por esta enzima, aunque el grado de actividad fue mucho menor que para la POD (Figura 7.13B). Los datos indicaron que la participación de PPO en el proceso de lignificación es complejo y falta mayor evidencia científica que permita elucidar su papel en el proceso.

Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para los sustratos utilizados se muestran en el Cuadro 7.4. La mayor actividad se obtuvo con el alcohol coniferílico, lo cual es razonable ya que la enzima peroxidasa está involucrada en el último paso de la polimerización de los alcoholes cinamílicos para formar ligninas (Imberty et al., 1985). Se ha reportado que cuando la enzima cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) presenta baja actividad, el coniferaldehído y el sinapaldehído son incorporados en la lignina de manera similar que los alcoholes (Ralph et al., 1997).

Los bajos valores de  $K_m$  para los sustratos fenólicos estudiados indican una alta afinidad de la enzima por estos sustratos. Esto explica el por qué no se encontraron en forma libre en los extractos fenólicos antes estudiados; haciendo suponer que la enzima los utiliza rápidamente y los transforma en compuestos derivados de ellos o en polímeros probablemente del tipo de las ligninas.

También se ha señalado que los monolignoles son compuestos relativamente tóxicos, por lo cual se glucosilan rápidamente para darles formas transportables y ser traslocados a la pared celular, en donde forman las ligninas que son compuestos insolubles (Strack, 1997).

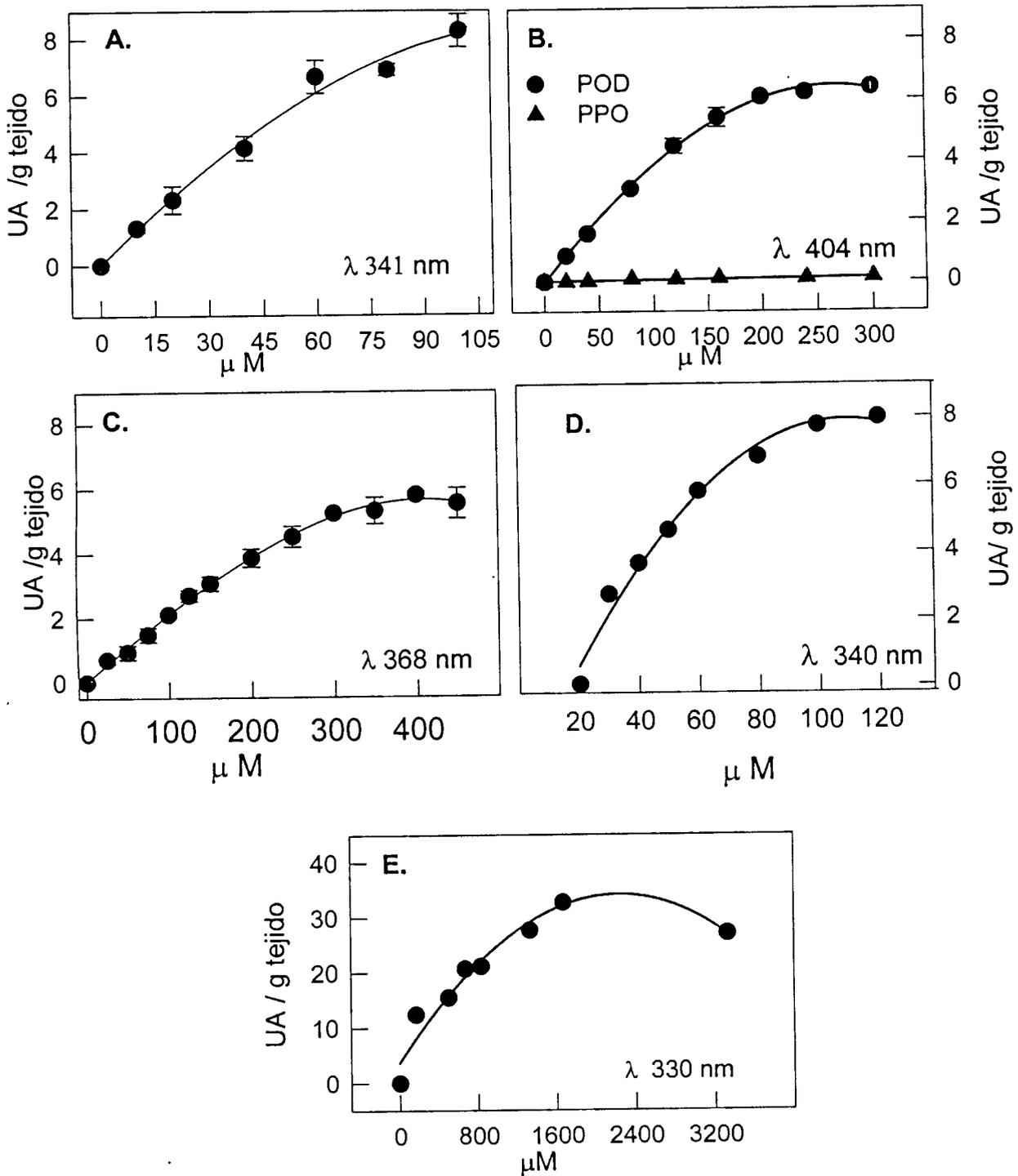


Figura 7.13. Efecto de la concentración del ác. cumárico (A), ác. caféico (B), ác. ferúlico (C), coniferaldehído (D) y alcohol coniferílico (E) sobre la actividad de POD.

Cuadro 7.4. Constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidades máximas ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para POD utilizando diferentes fenoles.

| Sustrato             | $K_m$ ( $\mu M$ ) | $V_{m\acute{a}x}$ (UA POD/g) |
|----------------------|-------------------|------------------------------|
| Ácido cumárico       | 40.0              | 8.3                          |
| Ácido caféico        | 84.0              | 6.4                          |
| Ácido ferúlico       | 150.0             | 5.8                          |
| Coniferaldehído      | 42.5              | 8.0                          |
| Alcohol coniferílico | 580.0             | 34.0                         |
| Ácido sinápico       | ND                | ND                           |
| Sinapaldehído        | ND                | ND                           |
| Alcohol sinapílico   | ND                | ND                           |

$K_m$ : Constante de Michaelis-Menten

$V_{m\acute{a}x}$ : Velocidad máxima

UA: Unidades de actividad

ND: No detectable.

### 7.8. Actividad de POD utilizando como sustratos los compuestos fenólicos solubles en etanol obtenidos a partir del tejido de jícama

Los compuestos fenólicos intermediarios en la biosíntesis de ligninas (estándares) mostraron ser buenos sustratos para la actividad de la enzima peroxidasa; sin embargo, no se detectó su presencia en el extracto etanólico del tejido de jícama.

La Figura 7.14 muestra la actividad de la enzima peroxidasa utilizando como sustrato diferentes fracciones de compuestos fenólicos solubles en etanol y que fueron extraídos de la superficie de los cilindros de jícama almacenados durante 6 días. Ninguna de las fracciones mostró ser un buen sustrato para POD si se compara con la actividad que se obtuvo cuando se utilizó como sustrato al alcohol coniferílico ( $V_{m\acute{a}x}=34$  UA/g).

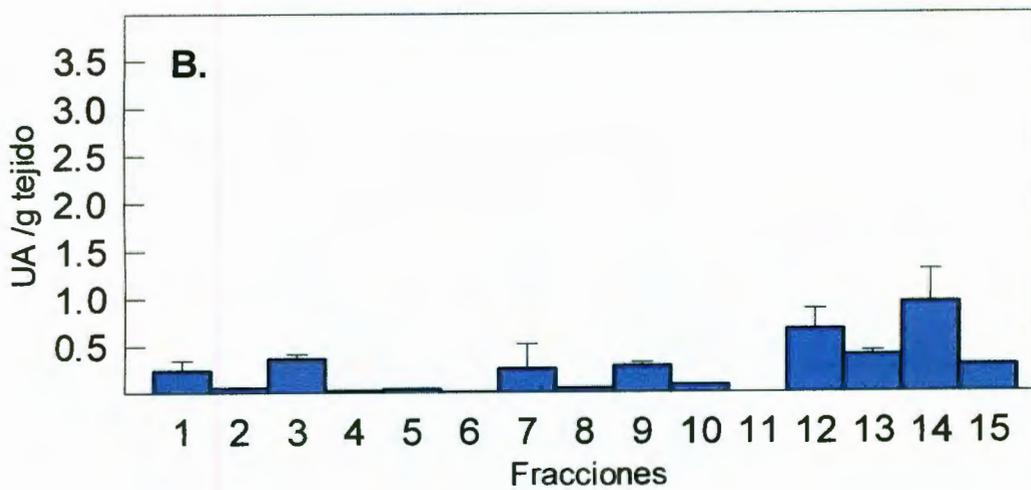
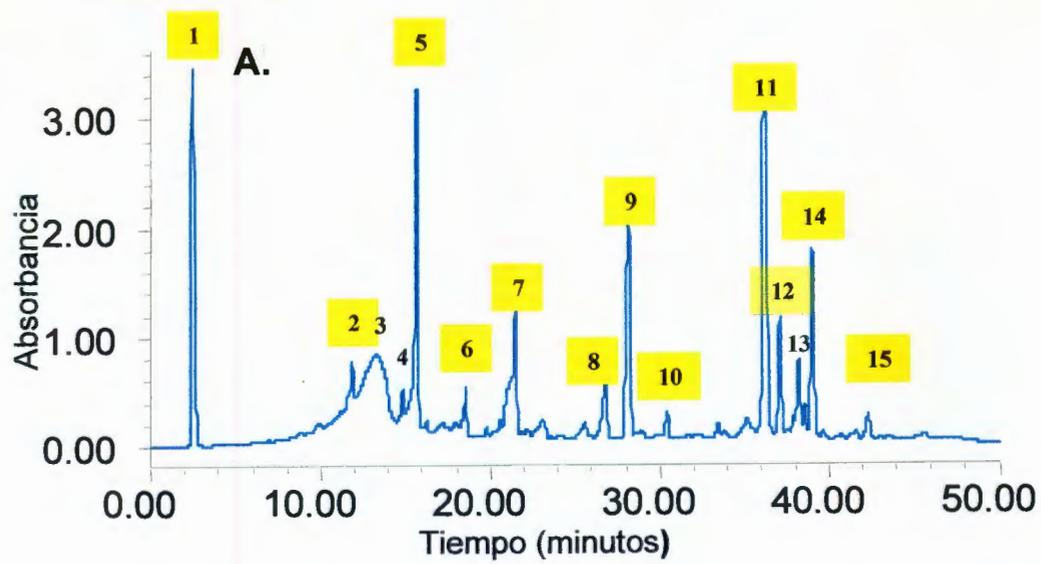


Figura 7.14 Fracciones de compuestos fenólicos colectadas (A) y utilizadas como sustrato para POD (B).

## 7.9. Cambios en el contenido de lignina durante el oscurecimiento de los cilindros de jícama

Dada la evidencia sobre el posible proceso de lignificación durante el almacenamiento de los cilindros, se planteó hacer una cuantificación global de ligninas.

La lignina es un complejo polimérico importante que sirve como soporte mecánico, transporte de agua y defensa de las plantas y su síntesis puede ser inducida como una respuesta al daño mecánico con el objeto de crear una barrera física y evitar la destrucción del tejido (Strack, 1997). Este polímero es insoluble en todos los disolventes, por lo que es necesaria su degradación química para su análisis. Una práctica común es degradarla a compuestos de bajo peso molecular, siendo la tioacidólisis el método más común (Lu y Ralph, 1997).

El contenido inicial de ligninas en el tejido fresco, expresado como  $\mu\text{g}$  de ác. cumárico fue de 16.6 por gramo de tejido. Durante el almacenamiento de las piezas, estos valores se incrementaron en 1.7, 2.86 y 3.14 veces en los días 2, 4, y 6, respectivamente (Figura 7.15A). El comportamiento mostrado por el contenido de ligninas fue similar a los cambios de color, expresados por el parámetro de cromaticidad (Figura 7.15B), siendo el coeficiente de correlación  $r^2 = 0.8765$ .

Estos resultados dieron mayor evidencia de que el oscurecimiento del tejido se debe a un proceso de lignificación. Sin embargo, para demostrar esta hipótesis, se requirió probar la presencia de los intermediarios de la síntesis de lignina en el tejido y además probar si la aplicación de estos intermediarios al tejido fresco, generan el oscurecimiento.

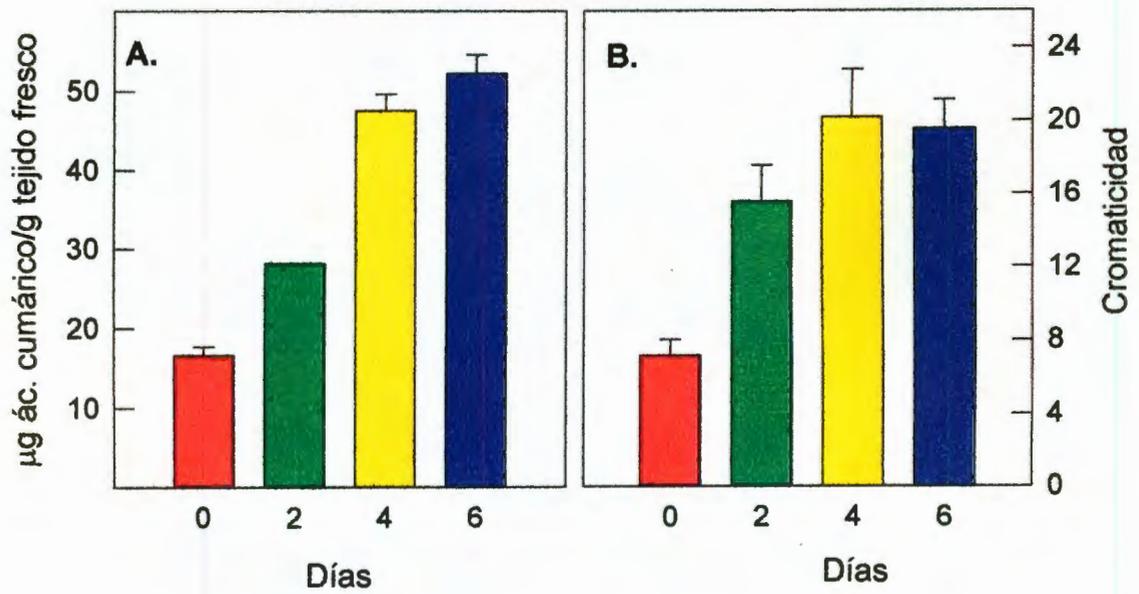


Figura 7.15 . Cambios en el contenido de ligninas (A) y cromaticidad (B) en la parte externa de cilindros de jícama almacenados durante 6 días.

### 7.10. Ensayos *in vivo* de la participación de PPO, POD y los compuestos intermediarios de la síntesis de lignina en el desarrollo del oscurecimiento

La Figura 7.16 muestra el ensayo *in vivo* realizado en cilindros de jícama control (embebidos con amortiguador de fosfatos), así como en presencia del mismo amortiguador añadidos de catecol (ensayo para PPO) y otro con peróxido de hidrógeno (ensayo para POD). Puede observarse claramente que las muestras expuestas con peróxido de hidrógeno se oscurecieron visiblemente lo cual demostró nuevamente la participación más importante de la peroxidasa en el proceso de oscurecimiento.

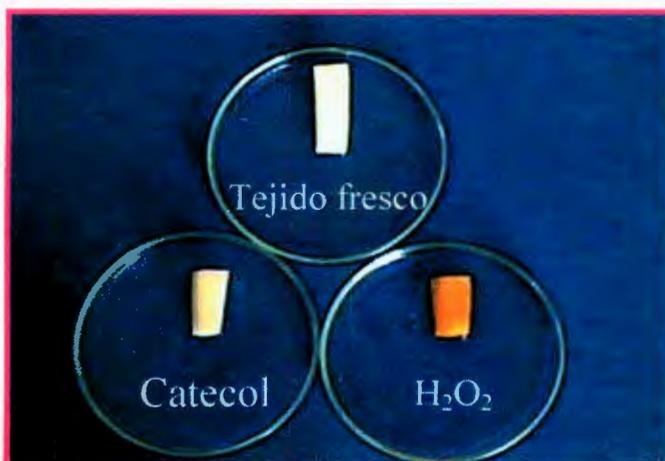


Figura 7.16. Prueba histoquímica en amortiguador conteniendo catecol o peróxido de hidrógeno.

La Figura 7.17 muestra el mismo tipo de ensayo *in vivo* para cilindros de jícama expuestos a compuestos intermediarios de la síntesis de ligninas. Se observó nuevamente que hubo desarrollo de color evidente cuando el tejido fue expuesto al ácido ferúlico y en menor grado para el ácido cumárico.

Este ensayo demostró la importancia de la peroxidasa en el proceso de oscurecimiento y la síntesis de lignina como una de las vías que llevan al oscurecimiento.



Figura 7.17. Prueba histoquímica en amortiguador pH 4.5 conteniendo ác. cumárico o ác. ferúlico y peróxido de hidrógeno.

### 7.11. Determinación de algunos compuestos fenólicos presentes en el residuo insoluble

Si bien la actividad de la enzima peroxidasa explica, hasta el momento, parcialmente el oscurecimiento de las piezas de jícama, así como también se demostró que *in vitro* utiliza compuestos intermediarios en la síntesis de ligninas como sustratos, ninguno de estos compuestos fenólicos mostró estar presente en el extracto etanólico del tejido de jícama; esto puede ser debido a que los monolignoles producidos en el citoplasma son glucosilados por una monolignol glucosiltransferasa para darles formas transportables, las cuales son secretadas a la pared celular. En este sitio la glucosa es removida por una beta-glucosidasa y el monolignol liberado entra a la ruta de síntesis de las ligninas (Strack, 1997); lo anterior, aunado a la alta afinidad de la enzima por sus sustratos (bajos valores de  $K_m$ ), justifica el no encontrarlos en forma libre y por lo tanto estos compuestos deben de ser buscados en la fracción insoluble, es decir dentro de las ligninas ya formadas en la pared de las células.

Estas moléculas necesariamente están presentes en el residuo insoluble en etanol y para su análisis se requiere de otras técnicas de extracción. La primera de ellas fue realizar una hidrólisis alcalina del residuo insoluble.

Las ligninas *in situ* son insolubles en todos los disolventes, a menos que sean degradadas por tratamientos físico o químicos. Sin embargo, los tratamientos alcalinos podrían romper algunas uniones lábiles en álcali entre monómeros de lignina o entre ligninas y polisacáridos (Scalbert y Monties, 1986). Las uniones que involucran grupos funcionales como carboxílico o fenol, que son ionizados en solución alcalina, también pueden promover la solubilización de las ligninas, ya sea por el incremento en la solubilidad de fragmentos individuales o por la inducción del hinchamiento de la pared celular (Sun et al., 1995). También se considera que la solubilización alcalina de la hemicelulosa es debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno; además, todos los sustituyentes unidos por enlaces éster de la hemicelulosa y otros componentes de la pared celular pueden ser separados en medio alcalino. Esto tiende a incrementar la hidrofobicidad y por lo tanto la solubilidad del material (Sun et al., 1995).

La hidrólisis alcalina del residuo insoluble en etanol permitió la extracción de compuestos fenólicos ligeramente enlazados a la pared celular y éstos fueron separados por HPLC. La comparación de los TR y espectros de los estándares con los correspondientes picos de la muestra permitió la identificación de 5 picos. El Cuadro 7.5 muestra las características de algunos de los compuestos obtenidos con la hidrólisis alcalina.

Se encontraron dos ácidos hidroxicinámicos: el ácido cumárico y el ácido ferúlico en concentraciones de 0.1909 y 0.8239  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco, respectivamente; estos ácidos también se han encontrado en la pared celular de las gramíneas (Pan et al., 1998). Como una molécula bifuncional con sitios de enlace carboxílico y fenólico, estos ácidos fenólicos proveen un medio para el entrecruzamiento entre los polímeros de la pared celular (Scalbert et al., 1985). El ácido *p*-cumárico está principalmente esterificando a las ligninas, mientras que el

ácido ferúlico es capaz de enlazar cadenas de arabinoxilanos para formar dímeros; también puede unirse a las hemicelulosas a través de un enlace éster o entre la misma molécula de lignina con un enlace éter para el entrecruzamiento de la lignina y los polisacáridos (Pan et al., 1998).

Cuadro 7.5. Contenido de compuestos fenólicos obtenidos del residuo insoluble en etanol (hidrólisis alcalina).

| TR (min) | $\lambda$ (nm)      | Compuesto           | $\mu\text{g/g}$ tejido |
|----------|---------------------|---------------------|------------------------|
| 9.08     | 253.7               | Ác. hidroxibenzóico | 0.4820                 |
| 16.47    | 229.9, 277.5, 306.2 | Vainillina          | 0.7013                 |
| 18.04    | 215.6, 306.2        | Siringaldehído      | 0.5156                 |
| 18.65    | 225.1, 311          | Ác. cumárico        | 0.1909                 |
| 19.86    | 215.6, 315.8        | Ác. ferúlico        | 0.8239                 |

TR: Tiempo de retención

$\lambda$ : Longitud de onda de máxima absorción

El ferulato puede estar esterificando a arabinosa o a arabinoxilanos antes de ser transportado a la pared celular y se ha observado que participa en el entrecruzamiento entre los polímeros de lignina y los polisacáridos de la pared celular. Estudios en pasto indicaron que los ésteres del ferulato puede funcionar como un sitio en el cual los monómeros de lignina se unen y a partir del cual crecen los polímeros de lignina (Migné et al., 1998; Whetten et al., 1998).

La concentración de vainillina y siringaldehído en el tejido fue de 0.7013 y 0.5156  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco, respectivamente, estos compuestos pueden ser producto de la degradación parcial de las ligninas. También se identificó en el tejido al ácido *p*-hidroxibenzoico en una concentración de 0.4820  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco; este ácido es uno de los cuatro ácidos aparentemente universales en las angiospermas y es un constituyente de las ligninas (Macheix, 1990).

## 7.12. Caracterización del tipo de ligninas

Uno de los problemas principales para la caracterización de las moléculas de lignina es que éstas son muy estables y se requiere de condiciones muy drásticas para poder romperlas y con ello poder identificar cada una de las unidades estructurales básicas de las mismas.

Los métodos tradicionales para el análisis de los monómeros de las ligninas han requerido su degradación química para liberar los residuos aromáticos sustituidos con patrones de hidroxilación/metoxilación similares a los de los monolignoles (Whetten et al., 1998). La oxidación con nitrobenzenu en medio alcalino se ha utilizado ampliamente para ensayar e identificar las unidades estructurales de las ligninas. Las ligninas que contienen los alcoholes coniferílico, *p*-cumarílico y siringílico son oxidadas con el nitrobenzenu y producen la vainillina, el *p*-hidroxibenzaldehído y el siringaldehído, respectivamente y son llamadas unidades de tipo G, H y S (Sun et al., 1996).

La oxidación alcalina con nitrobenzenu tiene ciertos inconvenientes como la degradación incompleta de las ligninas o bien, si las condiciones de tiempo y temperatura son demasiado drásticas se corre el riesgo de degradar las unidades estructurales. Este método ha sido desarrollado para el análisis de las ligninas presentes en cereales o maderas y no se encontraron referencias que nos indicaran que se ha realizado en frutas o en productos similares a la jícama por lo que se hizo necesario optimizar la técnica.

La Figura 7.18 muestra el contenido de vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído y siringaldehído generados de la reacción del residuo insoluble con el nitrobenzenu a 121°C en diferentes tiempos. El contenido de vainillina se incrementó con el tiempo de reacción. El 4-hidroxibenzaldehído se mantuvo casi constante después de 9 horas; sin embargo, el siringaldehído disminuyó después de 9 horas, por lo cual se decidió utilizar este tiempo de reacción para evaluar los cambios durante el almacenamiento del tejido.

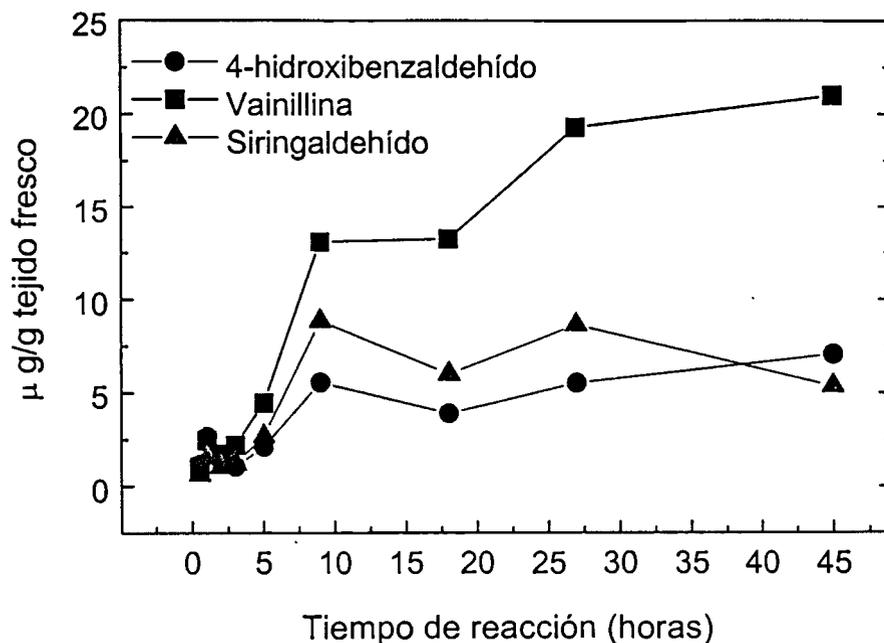


Figura 7.18. Concentración de los fenoles generados durante la oxidación con nitrobenceno.

De las unidades estructurales de la lignina (4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído), el compuesto que se encontró en mayor concentración fue la vainillina lo cual sugiere que las ligninas presentes en jícama son principalmente de tipo G (o que contienen principalmente unidades de alcohol coniferílico) y en menor proporción el siringaldehído (unidades S) y el *p*-hidroxibenzaldehído (unidades H). Esto coincide con los reportes para las ligninas de las angiospermas (como es el caso de la jícama) en los cuales se señala que este tipo de plantas contiene unidades de tipo G y S y en pequeña proporción unidades de tipo H (Whetten et al., 1998).

La Figura 7.19 muestra el cromatograma de los compuestos obtenidos después de 9 horas de oxidación del residuo insoluble en etanol con el nitrobenceno. En esta Figura se señalan los compuestos 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído que fueron identificados por la comparación de su tiempo de retención y espectro uv con el de los estándares correspondientes.

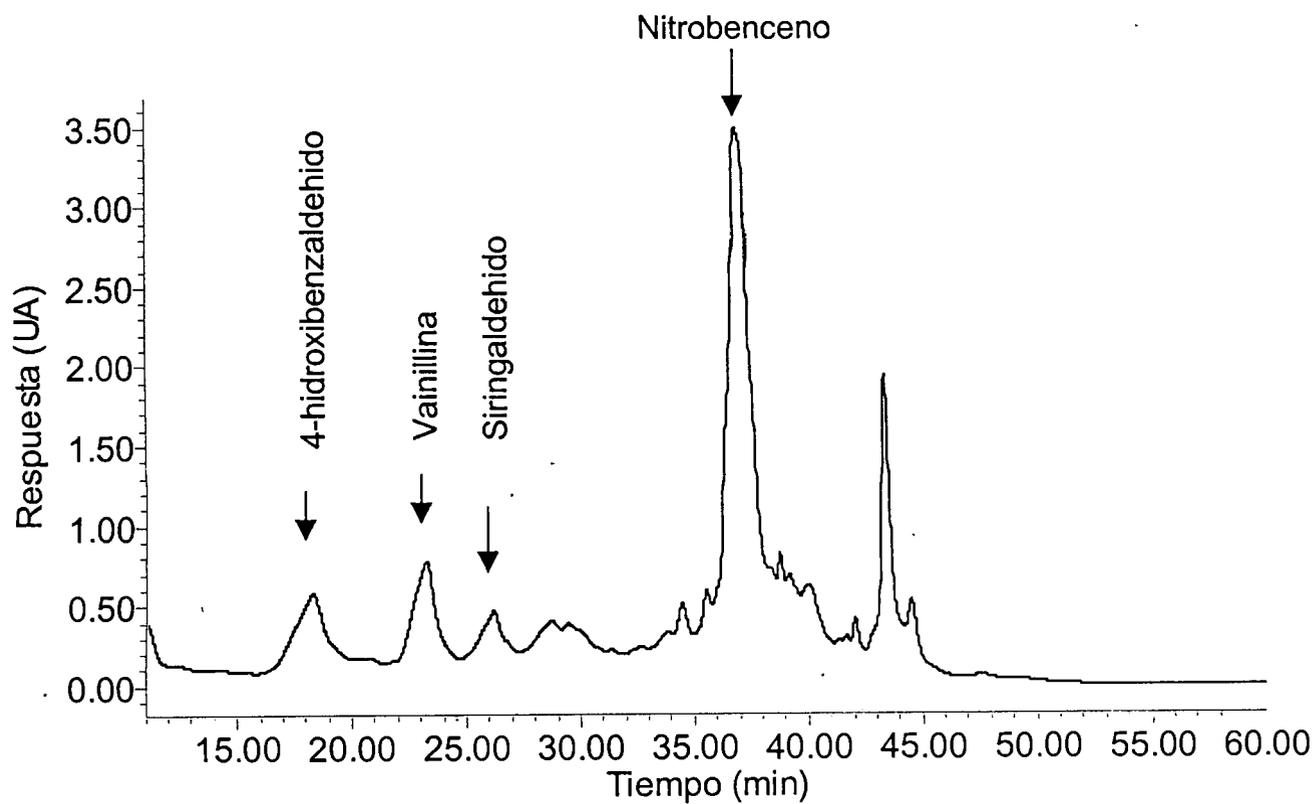


Figura 7.19. Cromatograma de compuestos fenólicos producidos durante la oxidación del residuo insoluble en etanol con nitrobenceno.

El pico con mayor absorbancia corresponde al nitrobenzeno en exceso que no reaccionó con la muestra. Los picos al final del cromatograma no fueron identificados, podrían ser fragmentos de lignina producto de la reacción incompleta de la muestra.

Los cambios en la concertación de las tres unidades estructurales de la lignina durante el almacenamiento de las piezas de jícama se muestran en la Figura 7.20. La concentración de la vainillina se incremento en el día 2 alcanzando valores de alrededor de 8  $\mu\text{g/g}$  tejido, después de este tiempo la concentración disminuyó a valores de 6  $\mu\text{g/g}$  tejido. En el día 6 la concentración nuevamente incrementó a un valor de 13  $\mu\text{g/g}$  tejido. Este comportamiento es similar al del alcohol coniferílico durante la formación de ligninas en las células de las traqueidas observado por Sato (2001). Este autor experimentó con cultivos celulares de la planta *Zinnia* y observó que la concentración del alcohol coniferílico incrementó cuando empezó el engrosamiento de la pared celular secundaria. Después de 48 horas, la concentración del alcohol coniferílico repentinamente disminuyó. Después de esto, la concentración incrementó nuevamente. Para explicar este comportamiento, se propuso un modelo de lignificación en las traqueidas que experimentan muerte celular programada. Este modelo sugiere que antes del engrosamiento de la pared celular secundaria los monolignoles son secretados de todas las células del tejido. Los monolignoles son acumulados en el medio en este periodo. Después de la muerte celular programada de las traqueidas, cesa la secreción de los monolignoles de estas células e incrementa la secreción de monolignoles de las células del parénquima del xilema, con lo cual se incrementa nuevamente el contenido de alcohol coniferílico.

La concentración de las otras dos unidades estructurales de las ligninas en el tejido dañado se modificó de manera diferente a la vainillina. El contenido de 4-hidroxibenzaldehído y siringaldehído se incrementó durante todo el almacenamiento, ligeramente en los primeros 4 días y en mayor proporción en el día 6 (Figura 7.20).

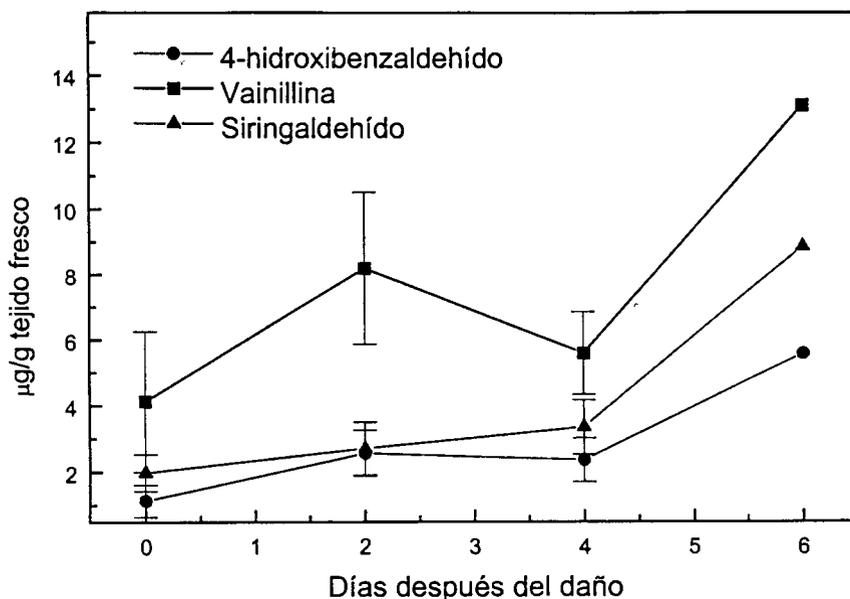


Figura 7.20. Cambios en el contenido de 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído durante el almacenamiento de los cilindros de jícama.

El Cuadro 7.6 muestra el cambio en la relación de la concentración de las unidades estructurales G:S:H durante el almacenamiento del tejido. En tejido fresco la relación entre las unidades G:S:H fue de 1:0.48:0.27, después de 6 días de almacenamiento la relación fue de 1: 0.68:0.43, lo que sugiere que las ligninas que se formaron durante el daño son diferentes a las del tejido fresco. Un comportamiento diferente fue reportado por Uritani y Oba (1978) quienes encontraron que en camote las unidades estructurales de las ligninas producidas por el daño fueron las mismas que las presentes en el tejido fresco (principalmente unidades de tipo G).

Se ha sugerido que la enzima cinamoil alcohol deshidrogenasa (CAD) pudiera regular la formación del tipo de ligninas. CAD está involucrada en la conversión de los cinamaldehídos a los correspondientes alcoholes y cataliza el último paso de la formación de los precursores de ligninas. Ketsuki et al. (1982) realizaron estudios *in vitro* encaminados a examinar las diferencias en la especificidad del sustrato entre las plantas angiospermas y gimnospermas. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad reductora de la enzima CAD,

extraída de angiospermas y de gimnospermas para coniferaldehído y sinapaldehído difirieron marcadamente. La enzima CAD obtenida de 8 especies de gimnospermas tiene una gran afinidad para el coniferaldehído, pero una baja actividad para el sinapaldehído, mientras que para la CAD de 7 especies de angiospermas, ambos aldehídos fueron buenos sustratos. Esto sugiere que CAD es una enzima que podría regular la formación del tipo de ligninas, además de la enzima O-metil transferasa (OMT). Los cambios de la proporción del tipo de ligninas durante el oscurecimiento de los cilindros de jícama pudieran estar explicados por la presencia de isoenzimas de CAD. Sin embargo, para los fines de esta investigación no se consideró analizar la actividad de esta enzima.

Cuadro7.6. Relación del tipo de lignina durante el almacenamiento.

| Tiempo (días) | Relación G:S:H |
|---------------|----------------|
| 0             | 1:0.48:0.27    |
| 2             | 1:0.33:0.31    |
| 4             | 1:0.60:0.42    |
| 6             | 1:0.67:0.42    |

Algo que llamó la atención es que los estudios cinéticos realizados con el alcohol sinapílico o los compuestos relacionados con su biosíntesis, mostraron que no son sustrato para la enzima peroxidasa y sin embargo el análisis de las unidades estructurales demuestra la presencia de unidades de tipo S en el tejido de jícama.

La biosíntesis de los monolignoles involucra una serie de hidroxilaciones de los derivados del ácido cinámico. Recientemente, Humphreys et al. (1999) aportaron datos que hacen suponer que los modelos previos de la síntesis de ligninas reportados por Whetten y Sederoff (1995) y Campbell y Sederoff (1996) parecen ser incorrectos, al menos con respecto a las enzimas ferulato 5-hidroxilasa (F5H) y ác. caféico /ác. 5 hidroxiferúlico O-metil transferasa (COMT) ya

que aunque F5H es capaz de catalizar la conversión de ferulato a ferulato 5-hidroxiferulato, esta enzima tiene mayor afinidad por los últimos intermediarios en la ruta biosintética, el coniferaldehído y el alcohol coniferílico.

La Figura 2.3 esquematiza la ruta propuesta por Humphreys et al. (1999). Esta nueva ruta se propone con base a dos planteamientos. El primero es que la ruta ampliamente aceptada para la biosíntesis de los monómeros de siringilo, en la cual el ácido sinápico es activado a su correspondiente éster CoA por la 4-hidroxi cinamoil CoA ligasa (4CL), se ha cuestionado debido a que 4CL en *Arabidopsis* y otras plantas no tienen actividad hacia el ácido sinápico, sugiriendo que debe existir una ruta independiente a la de los monómeros de siringilo (Lee et al., 1997). Si los monómeros de la lignina de tipo siringilo son sintetizados a partir del coniferaldehído y/o alcohol coniferílico, una actividad de sinapoil CoA ligasa no es necesaria.

El segundo planteamiento que apoya la nueva ruta es que se ha elucidado una ruta alternativa para las subunidades de guaiacilo en la cual el *p*-cumaroil CoA es hidroxilado y subsecuentemente metilado para dar feruloil CoA (Ye y Varnes, 1995). La importancia de esta ruta ha sido demostrada por la supresión antisentido de la expresión de cafeoil CoA O-metil transferasa en plantas de tabaco, en las cuales se observó un decremento generalizado en la acumulación de las ligninas (Zhong et al., 1998).

Esta nueva ruta de síntesis de los monolignoles podría explicar la presencia de las ligninas de tipo S en el tejido de jícama, aún cuando los compuestos como el ác. sinápico, el sinapaldehído y el alcohol sinapílico no mostraron ser sustrato para la enzima peroxidasa.

### 7.13. Análisis por espectrometría de masas de las unidades estructurales de las ligninas

Par corroborar la presencia de las unidades estructurales de las ligninas en las piezas de jícama, los compuestos 4-hidroxibenzaldehído, siringaldehído y vainillina fueron separados por HPLC y analizados por espectrometría de masas utilizando la técnica de impacto de electrones.

La técnica de espectrometría de masas involucra la introducción de un compuesto en un sistema de baja presión del espectrómetro, donde es ionizado con suficiente energía, para también causar fragmentación de los enlaces químicos de la molécula original. Los iones cargados positivamente resultantes son acelerados en un campo magnético el cual dispersa y permite medir la abundancia relativa de los iones (Mabry, 1970); por lo tanto, un espectro de masas consiste de una serie de señales cada una de las cuales representa un fragmento del compuesto original, las señales son mostradas como una serie de líneas en una gráfica o en forma numérica y son ordenadas de acuerdo a la relación del peso molecular/carga de los fragmentos que ellos representan (Markham, 1982).

Los espectros de masas de los estándares puros del siringaldehído, la vainillina y el 4-hidroxibenzaldehído se presentan en las Figuras 7.21, 7.22 y 7.23, respectivamente.

La Figura 7.24 muestra el espectro de masas de una fracción de fenoles separada por HPLC e identificada previamente por su espectro uv, como siringaldehído. Los fragmentos mayoritarios  $m/z=181$ , 182, 167, 139 y 111 corresponden a los fragmentos del estándar del siringaldehído (Figura 7.21), lo cual confirma su identidad.

La Figura 7.25 corresponde al espectro de masas de una fracción de fenoles separada por HPLC e identificada previamente como vainillina. Los fragmentos mayoritarios de  $m/z = 151$  y 152 indicaron que la vainillina ciertamente

existe en esta fracción, aunque se observaron otros fragmentos que no corresponden al patrón de fragmentación de este compuesto.

Los fragmentos mayoritarios del estándar puro del 4-hidroxibenzaldehído son  $m/z = 121, 122, 93, 65, \text{ y } 39$  (Figura 7.23); estos fragmentos están presentes en el espectro de masas del compuesto fenólico previamente separado por HPLC e identificado, por su espectro uv, como 4-hidroxibenzaldehído (Figura 7.26); sin embargo, no son los más abundantes, lo que sugiere que la muestra está contaminada y requiere de mayor trabajo para aislarlo.

Los resultados del análisis de los espectros de masas de la vainillina y el 4-hidroxibenzaldehído indicaron que estos compuestos ciertamente existen en las fracciones analizadas; sin embargo, también sugirieron una mayor purificación de estas fracciones, aspecto que sale fuera de los objetivos del presente trabajo.

#### **7.14. Mecanismo propuesto para la formación del oscurecimiento en piezas de jícama**

El daño mecánico ocasionado al tejido en el momento de obtener las piezas provoca una serie de eventos fisiológicos programados que tienen como finalidad cicatrizar las heridas a través del proceso de lignificación.

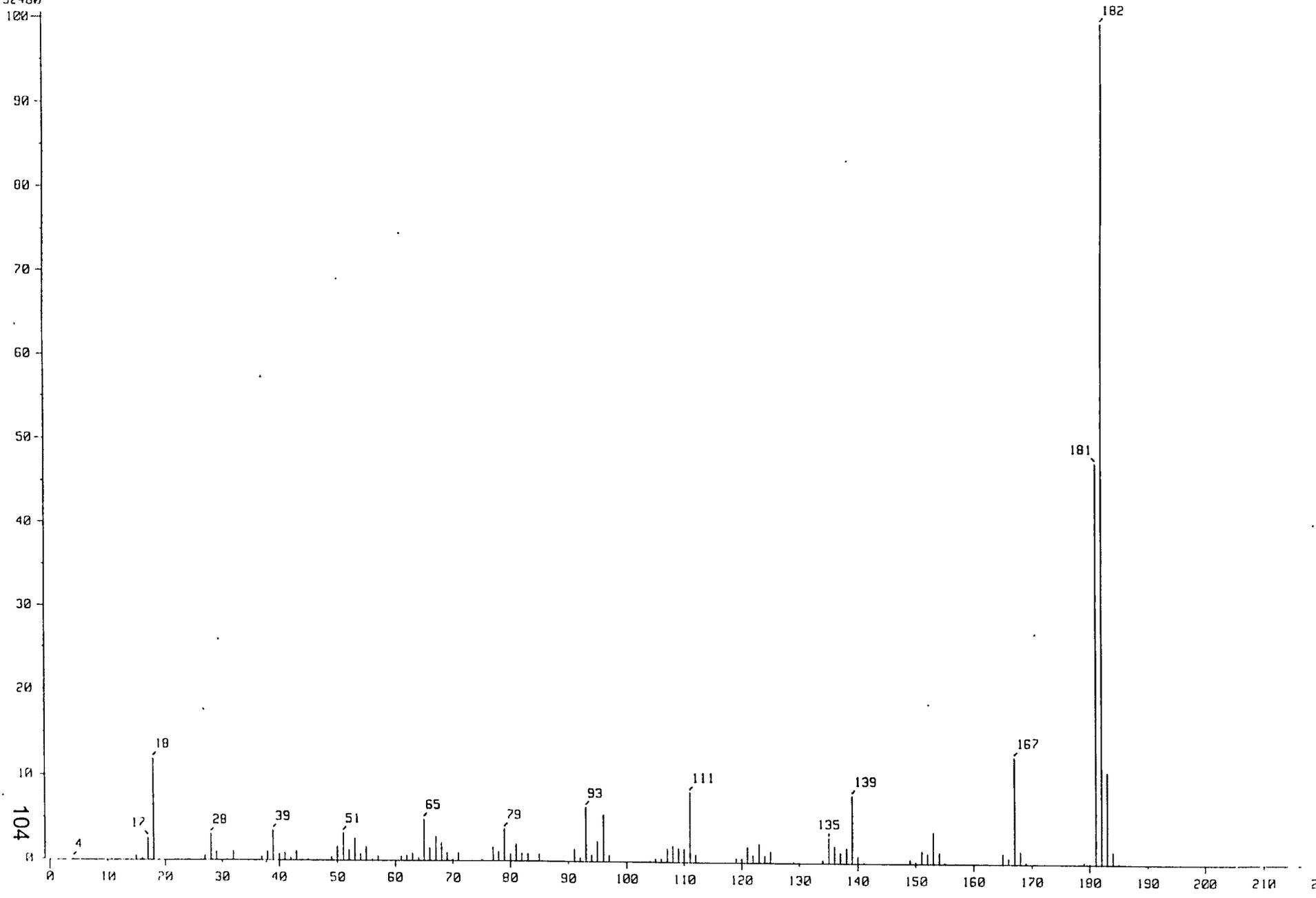
La Figura 7.27 podría ser un esquema adecuado para indicar los eventos que llevan a la formación de las ligninas en el tejido de jícama. Después de pocas horas la actividad de la enzima PAL se incrementa y en forma similar también se incrementa el contenido de fenoles solubles en etanol (la función biológica de estos compuestos pudiera ser como fitoalexinas). En el citoplasma se pone en marcha la biosíntesis de los fenil propanoides con el fin de formar los monolignoles (el alcohol coniferílico en mayor abundancia), estos compuestos son relativamente tóxicos e inestables por lo cual se glucosilan rápidamente para dar formas transportables y pasar a la pared celular, en este sitio actúa una  $\beta$ -glucosidasa liberando al monolignol. De acuerdo a los resultados, la enzima peroxidasa

polimeriza al monolignol formando estructuras complejas de ligninas principalmente de tipo G y S, estas estructuras contienen enlaces de tipo 8-O-4'.

Al inicio del almacenamiento los monolignoles son suministrados de todas las células cercanas al daño, sin embargo después de que las células superficiales sufren muerte celular programada los monolignoles son suministrados a partir de las células de las traqueidas del xilema. Finalmente las ligninas formadas en la superficie del tejido dañado imparten el color café a las piezas de jícama durante su almacenamiento.

File: 2192480  
Inlet: Direct Ion Mode: EI+  
Spectrum Type: Normal Ion [MF-Linear]  
RT: 0.70 min Scan#: (15,33)-(12,18) Temp: 44.0 deg.C  
EI: m/z 102.0000 Int.: 207.89  
Output m/z range: 0.0000 to 223.1454 Cut Level: 0.00 %

Figura 7.21. Espectro de masas del compuesto puro de siringaldehído.



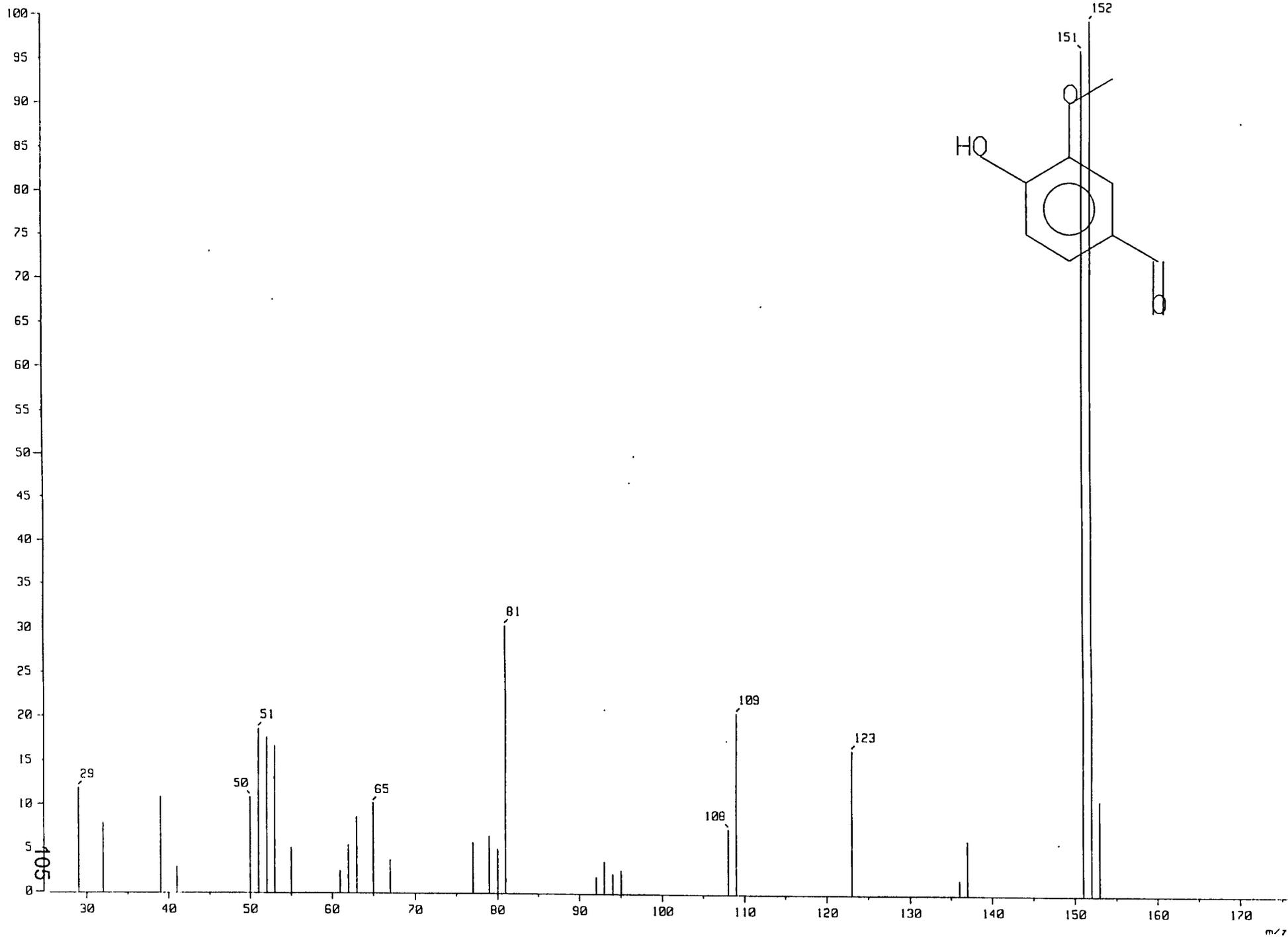
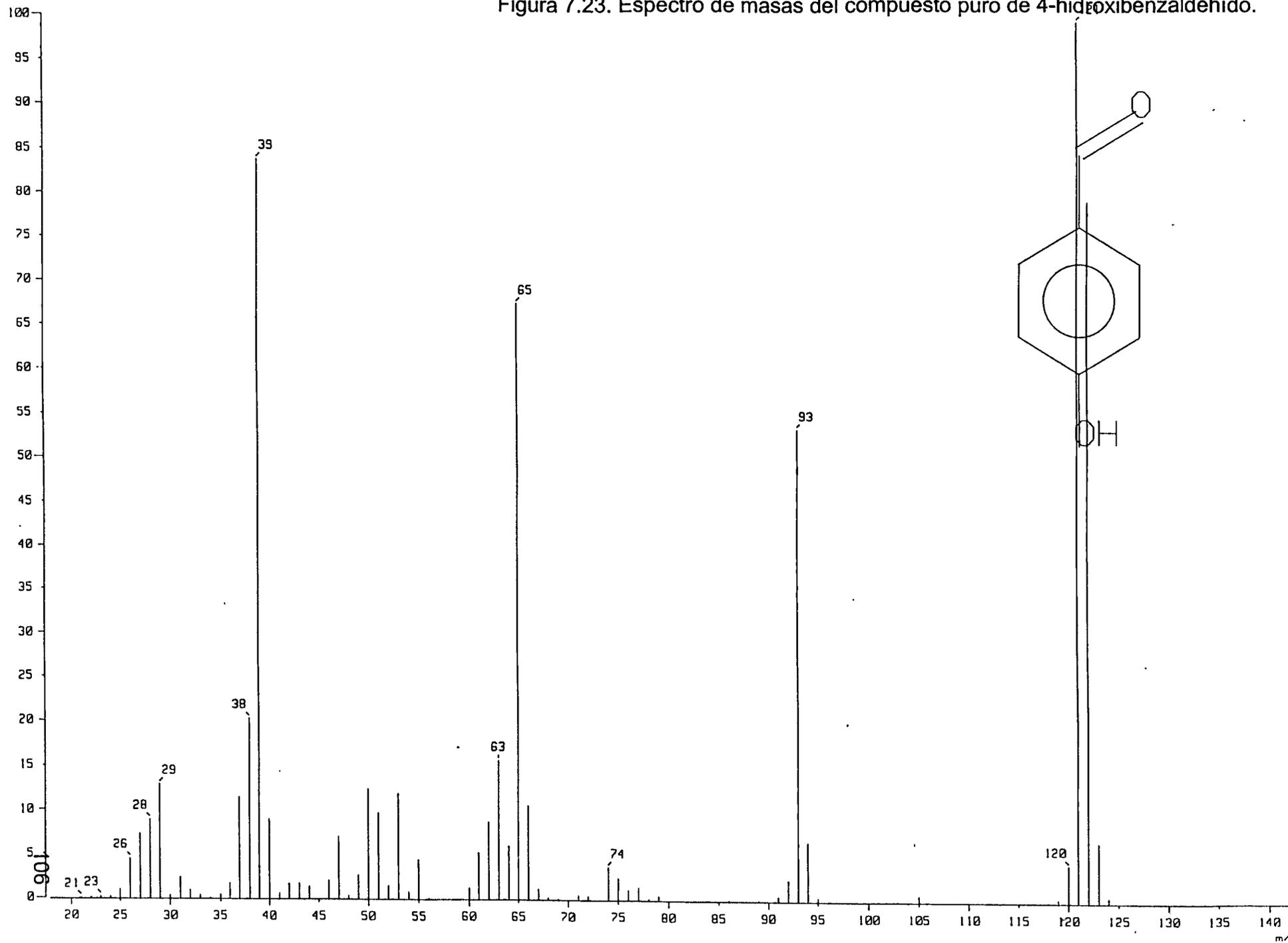
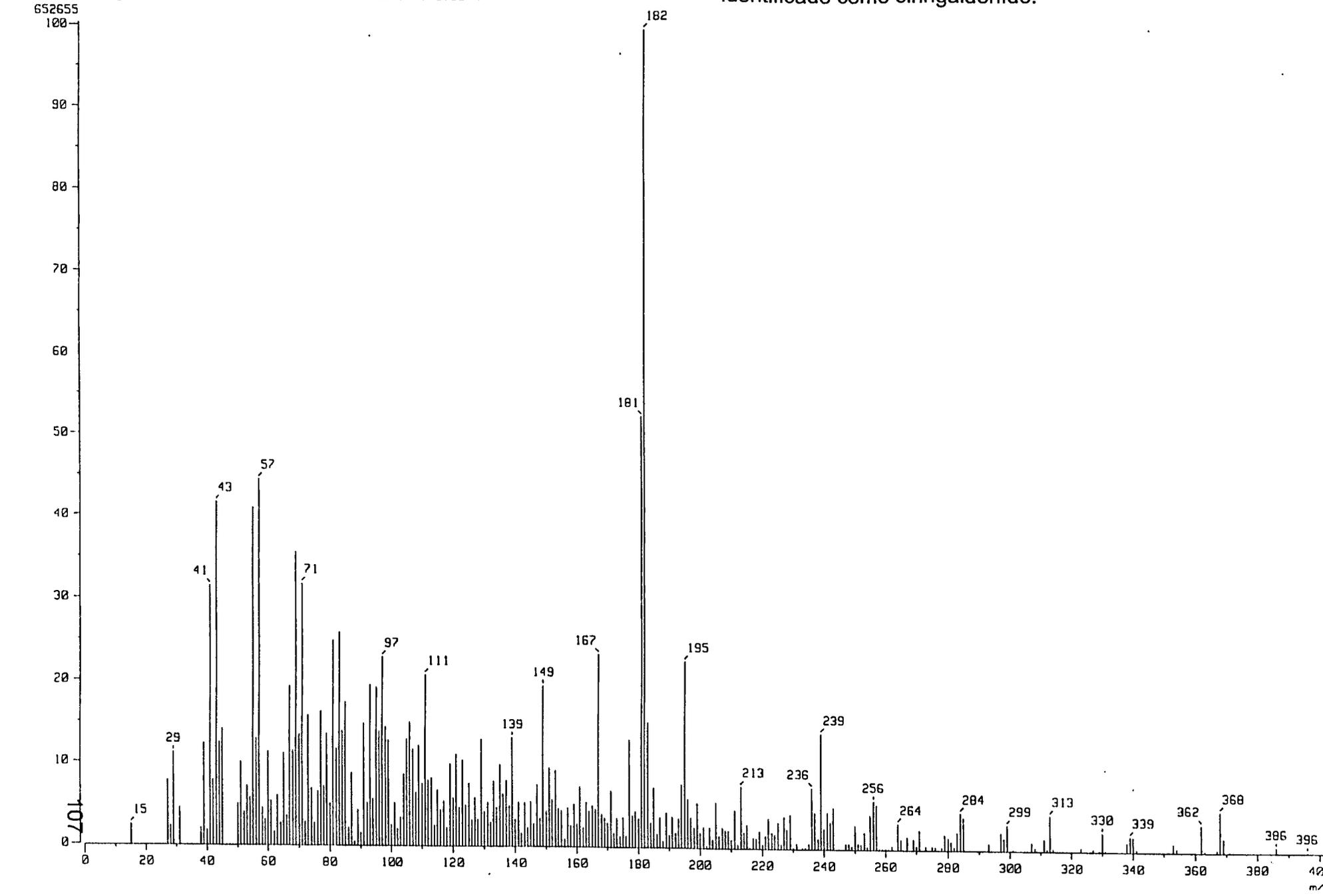


Figura 7.23. Espectro de masas del compuesto puro de 4-hidroxibenzaldehído.



Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 1.54 min Scan# : (12,93)-(2,11) Temp : 94.5 deg.C  
BP : m/z 182.0000 Int. : 62.06  
Output m/z range : 0.0000 to 403.5608 Cut Level : 0.00 %

Figura 7.24. Espectro de masas del compuesto previamente identificado como siringaldehído.



Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
R1 : 1.18 min Scan# : (8,73)  
BP : m/z 151.0000 Int. : 43.63  
Output m/z range : 9.4955 to 416.6172  
Temp : 59.2 deg.C  
Cut Level : 0.00 %

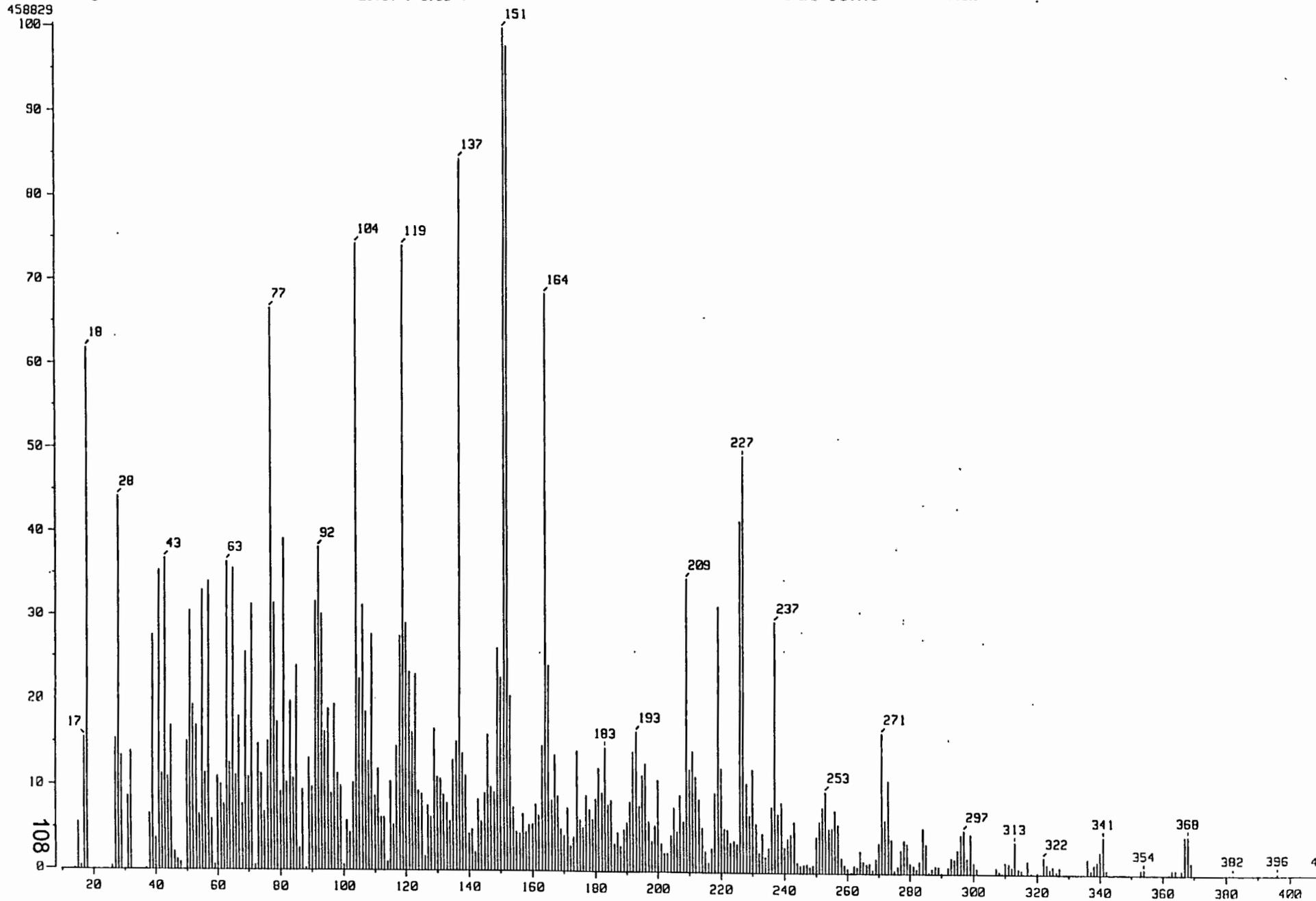


Figura 7.25. Espectro de masas del compuesto previamente identificado como vainillina.

Sample: Nbc1  
Note : Lab-Espectrometria masas IQ UNFM  
Inlet : Direct [Ion Mode : EI+]  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 1.54 min Scan# : (13,91)-(81,93) Temp : 72.4 deg.C  
BP : m/z 18.0000 Int. : 23.69  
Output m/z range : 16.6172 to 434.4214 Cut Level : 0.00 %  
101935 18 .

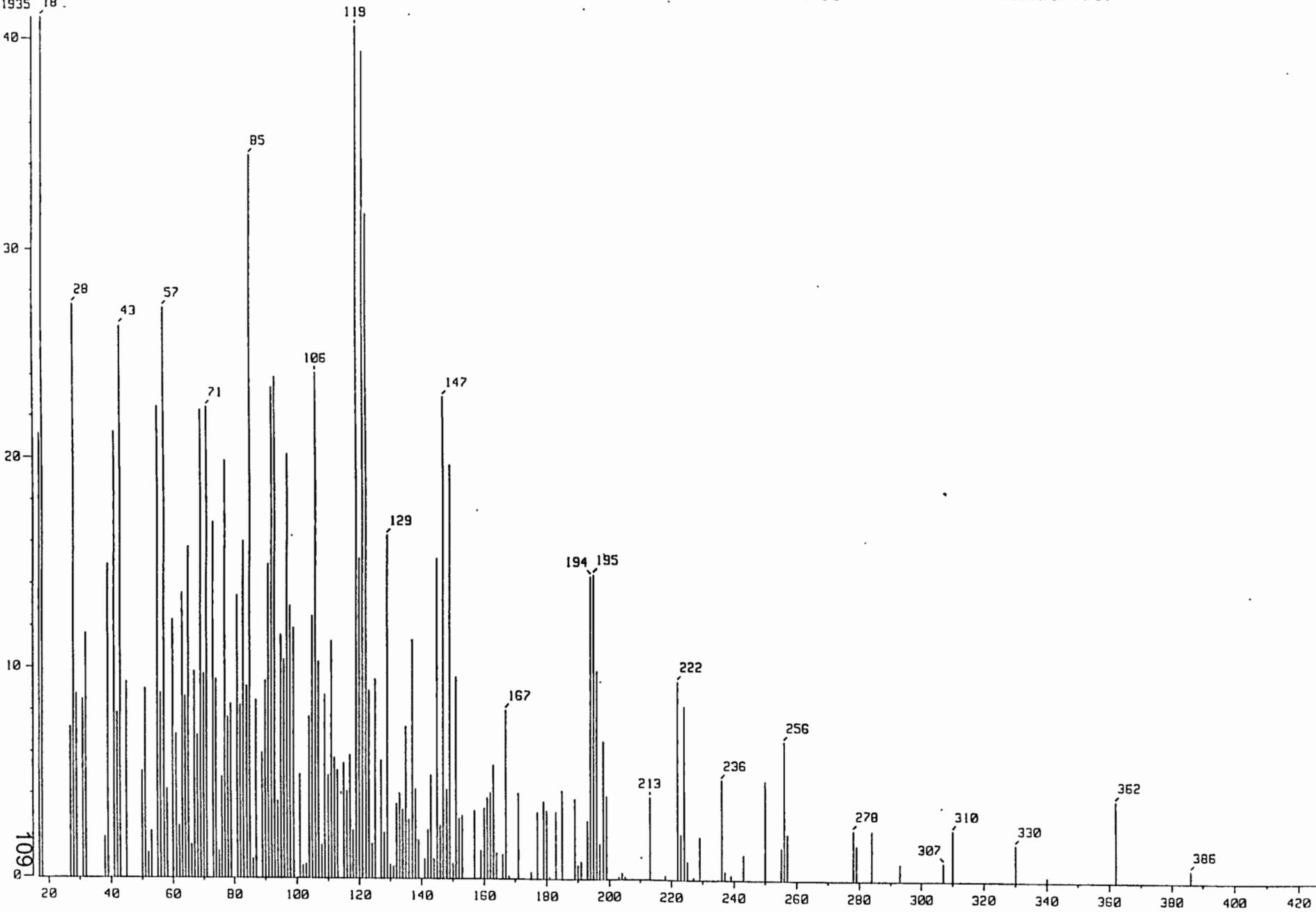


Figura 7.26. Espectro de masas del compuesto previamente identificado como 4-hidroxibenzaldehído.

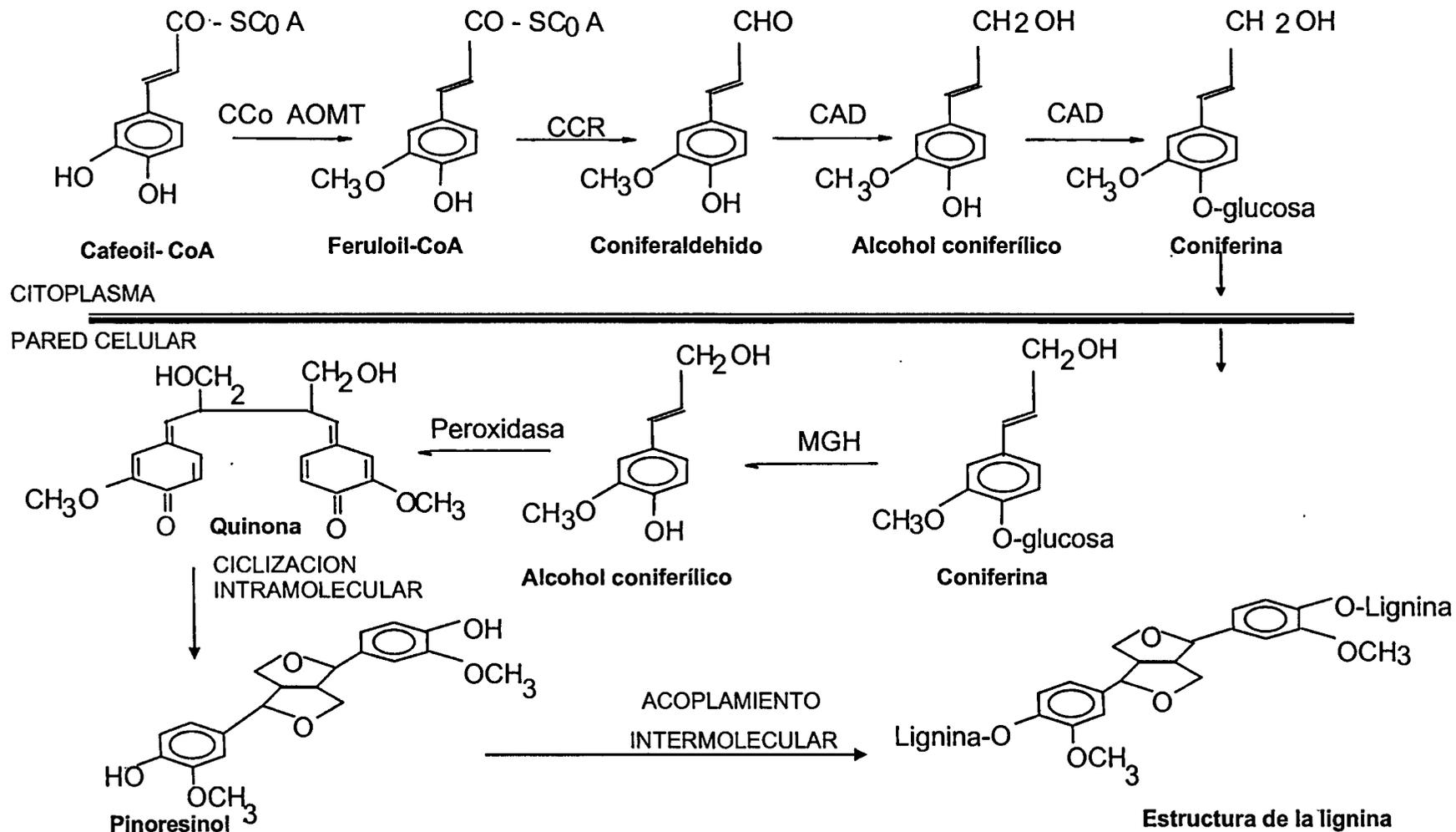


Figura 7.27. Mecanismo propuesto para explicar la formación de ligninas a partir del alcohol coniferílico (Adaptado de Strack, 1997). CCoAOMT: Cafeoil CoA oximetil transferasa. CCR: Cinamoil CoA reductasa. CAD: Cinamoil alcohol deshidrogenasa.

## 8. CONCLUSIONES

- El daño mecánico provocado al tejido durante la elaboración de las piezas de jícama indujo la síntesis de compuestos fenólicos y éstos se localizaron principalmente en la zona dañada.
- Los compuestos fenólicos solubles en etanol presentes en el tejido de jícama no fueron buenos sustratos para las enzimas PPO y POD.
- El cambio de color mostró una alta correlación con el contenido total de fenoles y ligninas.
- La enzima POD tiene un papel fundamental en el proceso de oscurecimiento a través de su participación en la síntesis de ligninas.
- Las ligninas presentes en el tejido de jícama están principalmente constituidas por unidades de alcohol coniferílico y alcohol sinapílico.
- La síntesis de ligninas es uno de los factores importantes que promueve el desarrollo del color oscuro en la jícama mínimamente procesada.
- Considerando los resultados, se sugiere que una de las estrategias más adecuada para controlar el oscurecimiento en cilindros de jícama podría ser diseñada en función de impedir la actividad de la peroxidasa o bloquear la síntesis de lignina.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abeles, F.B. y Biles, C.L. 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol.* 95: 269-273.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S. y Nicolas, J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* 57: 958-962.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S. y Oleszek, W. 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1132-1137.
- Andreasen, M., Christensen, L.P., Meyer, A.S. y Hansen, A. 2000. Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2837-2842.
- Aquino-Bolaños, E.N., Cantwell, M.I., Peiser, G. y Mercado-Silva, E. 2000. Changes in the quality of fresh-cut jicama in relation to storage temperatures and controlled atmospheres. *J. Food Sci.* 65(7):1238-1243.
- Bernards, M., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R. Yang, X., Sabatino, A. y Plourde, G.L. 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology.* 121: 135-145.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brecht, J. 1995. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. *HortScience* 30: 18-22.
- Burns, J. 1995. Lightly processed fruit and vegetables: *HortScience* 30:14.
- Burton, W.G. 1982. Post-harvest physiology of food crops. Longman. London.
- Campa, A. 1991. Biological roles of plant peroxidases: Known and potential function. En *Peroxidases in chemistry and biology*. Everse, J., Everse, K.E. y Grisham, M.B. (Eds). CRC Press. Boca Raton.
- Campbell, M.M. y Sederoff, R.R. 1996. Variation in lignin content and composition. *Plant Physiol.* 110: 3-13.
- Cantwell, M. 1998a. Introduction. En *Fresh-cut products: Maintaining quality and safety*. UC Davis. Postharvest Hort. Series No. 10.
- Cantwell, M. 1998b. Fresh-cut biology and requirements. En *Fresh-cut products: maintaining quality and safety*. UC Davis. Postharvest Hort. Series No. 10.

- Casanueva, E. 1995. Catzotl, raíz que mana del jugo. Cuadernos de Nutrición 18(1): 30-34.
- Cheynier, V.F., Basire, N. y Rigaud, J. 1988. Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. J. Agric. Food Chem. 37:1069-1071.
- Childs, R.E. y Bardsley, W.G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. Biochem. J. 145:93-103.
- Cisneros-Zevallos, L., Saltveit, M.E. y Krochta, J.M. 1995. Mechanism of surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage. J. Food Sci. 60:320-323.
- Coseteng, M.Y. y Lee, C.Y. 1985. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. J. Food Sci. 50(4): 985-989.
- Dixon, R. y Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant cell. 7:1085-1097.
- Dorantes-Alvarez, L. y Chiralt. 2000. Color of Minimal processed fruits and vegetables as affected by some chemical and biochemical changes. En Minimally processed fruits and vegetables. Alzamora, S.M., Tapia, M.S. y López-Malo, A. (Ed.). Aspen. USA. p 111.
- Douglas, C.J. 1992. General phenylpropanoid metabolism: regulation by environmental and developmental signals. En Phenolic metabolism in plants. Recent advances in Phytochem. 26:63-89.
- Duarte-Vázquez, M.A., García-Armendárez, B., Regalado, C. y Whitaker, J.R. 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. Esculenta D.C.) peroxidases. J. Agric. Food Chem. 48:1574-1579.
- Fernández, M.V., Marid, W.A., Loaiza, J.M., Martínez, J.J. y Serrano, A. 1996. Effect of planting methods on root characters of jicama (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban). Jpn. J. Trop. Agr. 40(1): 26-28.
- Friedman, M. 1997. Chemistry and dietary role of potato polyphenols. A review. J. Agric. Food Chem. 45: 1523-1540.
- Galletti, G., Piccaglia, R., Chiavari, G. y Concialini, V. 1989. HPLC/Electrochemical detection of lignin phenolics from wheat straw by direct injection of nitrobenzene hydrolyzates. J. Agric. Food Chem. 37: 985-987.

- Goupy, P., Amiot, M.J., Richard-Forget, F. y Nicolas, J. 1995. Enzymatic browning and model solutions and apple phenolics extracts by apple polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 60.
- Gross, G. 1985. Biosynthesis y metabolism of phenolic acids and monolignols. En *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Higuchi, T. (Ed). Academic Press. New York. p 229-271.
- Hakim, S., Shabnam, Siddiqui, S.F y Nawaz, H. 1998. Studies on the activity of peroxidase in the crude extracts of sweet potato (*Ipomea batatus*), couliflower (*Brassica oleracea*), soybean (*Glicine max*) an Sourlime (*Citrus amantifolia*). *Pakistan J. Biol.Sci.* 1 (4):309-312.
- Hanson, K.R. y Havir, E.A. 1979. An introduction to the enzymology of phenylpropanoid biosynthesis. En Swain, T., Harborne, J.B. y Sumere, C.F. (eds). *The Biochemistry of plant phenolics*. Plenum Press, New York. p. 91-138.
- Harborne, J.B. 1974. Phenolic glycosides and their natural distribution. En *Biochemistry of phenolic compounds* (Harborne, J.D., ed.) Academic Press, London, p. 129-170.
- Hatfield, R. y Vermerris, W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol.* 126: 1351-1357.
- Heredia-Zepeda, A. y Heredia-García, E. 1994. San Miguelito, San Juan y Vega de San Juan nuevas variedades de jícama (*Pachyrhizus erosus*) para el Bajío, Guanajuato, México. En *Proc. First Intl. Symposium on Tuberous Legumes* Guadeloupe, F.W. Sørensen, M. (ed). p. 257-272.
- Howard, L.R. y Griffin, L.E. 1993. Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks. *J. Food Sci.* 58 (5): 1065-1067.
- Humphreys, J.M., Hemm, M.R. y Chapple. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifuncional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10045-10050.
- Hyodo, H., Kuroda, H. y Yang, S.F. 1978. Induction of phenylalanine-ammonia lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. *Plant Physiol.* 62: 31-35.
- Iiyama, K. y Lam, T.B.T. 1990. Lignin in wheat straw internodes. Part I: The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 51:481-491.

- Imberty, A., Goldberg, R. y Catesson, A.M. 1985. Isolation and characterization of populus isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta*. 164: 221-226.
- Instituto Nacional de la Nutrición. 1997. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos, tablas de uso práctico, México.
- Jaworski A.W y Lee, C.Y. 1987. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 35:257-259.
- Jiang, Y. y Miles, P.W. 1993. Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during enzymatic oxidation of catechin. *Phytochemistry*. 33(1): 29-34.
- Kader, A. y Mitcham, E. 1998. Standardization of quality. En *Fresh-Cut Products: Maintaining Quality and Safety UC Davis Postharvest Hort. Series No. 10.*
- Kahn, V., Goldshmidt, S., Amir, J. y Grant, R. 1981. Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. *J. Food Sci.* 46: 756-764.
- Kato, C., Uritani, I., Saijo, R. y Takeo, T. 1976. Cellular localization de particulate-bound polyphenol oxidase in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17:1045-1052.
- Ke, D. y Saltveit, M.E. 1989. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism, and susceptibility to russet spotting in Icerbeg lettuce. *Physiol. Plant.* 76: 412-418.
- Ketsa, S. y Atantee, S. 1998. Phenolics, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Postharv. Biol. Technol.* 14: 117-124.
- Ketsuki, H., Shimada, M. y Higuchi, T. 1982. Regulatory role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in the formation of guaiacyl and syringyl lignins. *Phytochemistry*. 21 (1):19-23.
- Kolattukudy, P.E. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* 62: 918-933.
- Kosuge, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytophath.* 7:195-222.
- Lagrimini, M.L. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant physiol.* 96: 577-583.
- Lagrimini, M.L., Vaughn, J., Erb, W.A. y Miller, S.A. 1993. Peroxidase overproduction in tomato: wound-induced polyphenol deposition and disease resistance. *HortScience* 28(3): 218-221.

- Larrigaudiere, C., Lentheric, I. y Vendrell, M. 1998. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled-atmosphere stored pears. *J. Sci. Food Agric.* 78: 232-236.
- Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. 1995. Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series 600, Washington D.C.
- Lee, C.Y. y Jaworski, A.W. 1990. Identification of some phenolics in white grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 41 (1):87-89.
- Lee, C.Y., Kagan, V., Jaworski, A.W. y Brown, S.K. 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38:99-101.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C. y Douglas, K.J. 1997. Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. *The plant Cell* (9): 1985-1998.
- López-Galvéz, G., Saltveit, M. y Cantwell, M. 1996. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. *Postharv. Biol. Tech.* 9: 223-233
- Lu, F. y Ralph, J. 1997. Derivatization followed by reductive cleavage DFRC method, a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2590-2592.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. y Thomas, M.B. 1970. The systematic identification of flavonoides. Springer-Verlag. USA. P. 41-150.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. 1990. Fruit Phenolics. CRC Press. Boca Raton, FL. p 1-378.
- Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoids identification. Academic Press, London. pp. 37-40.
- Mayer, A.M. y Harel, E. 1979. Review: Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry.* 18:193-215.
- McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27: 1254-1260.
- Meraz-Caro, R. 2001. Efecto de la conservación en refrigeración y de las antocianinas en el desarrollo de oscurecimiento de jícama. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Mercado-Silva, E. y Cantwell, M. 1998. Quality changes in jicama roots stored at chilling and nonchilling temperatures. *J. Food Quality* 21:211-221.

- Merken, H.M. y Beecher, G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* 48(3): 577-599.
- Migné, C., Prensier, G., Utile, J-P., Angibeaud, P., Cornu, A. y Grenet, E. 1998. Immunocytochemical localization of *para*-coumaric acid and feruloyl-arabinose in the cell walls of maize stem. *J. Sci. Food Agric.* 78:373-381.
- Miller, A.R. 1992. Physiology, Biochemistry and detection of bruising (mechanical stress) in fruits and vegetables. *Postharv. News Inf.* 3:53-58.
- Minolta corporation manual. 1994. Precise color communication. Minolta Corporation Instrument system division. Ramsey, N.J. p. 10-11.
- Montgomery, M.W. y Sgarbieri, V.C. 1975. Isoenzymes of banana polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 14:1245.
- Nicolas, J., Richard-Forget, F., Goupy, P., y J. Amiot, M.J., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nut.* 34(2): 109-157.
- Nimz, H.H. y Ludemann, H.D. 1976. Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectra of lignins: 6. Lignin and DHP acetates. *Holzforschung.* 30: 33-40.
- Oktay, M., Kufrevioglu, I. Kocacaliskan, I. y Sakiroglu, H. 1995. Polyphenoloxidase from Amasya apple. *J. Food Sci.* 60(3):494-496.
- Önnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G. y Henriksson, G. 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell.* 14: 1953-1962.
- Oszmianski, J. y Lee, C.Y. 1990. Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1202-1204.
- Pan, G.X., Bolton, J.L. y Gordon, J.L. 1998. Determination of ferulic and *p*-coumaric acids in wheat straw and the amounts release by mild acid and alkaline peroxide. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5283-5288.
- Paull, R. E. y Chen, N.J. 1988. Compositional changes in Yam Bean during storage. *HortScience* 23:194-196.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, F., Milrad, S., Tigier, H. y Valpuesta, V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and-suberin. *Plant Physiol.* 122: 1119-1128.
- Radi, M., Mahrouz, M., Jaouad, A., Tacchini, M., Aubert, M., Hugues, M. y Amiot, M.J. 1997. Phenolic composition, browning susceptibility, and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. *HortScience* 32(6):1087-1091.

- Ralph, J. MacKay, J.J., Hatfield, R.D., O'Malley, D.M., Whetten, R.W. y Sederoff, R.R. 1997. Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. *Science*. 277:235-239.
- Reed, G. 1975. Oxidoreductasas. En *Peroxidase and its relationship to food flavor and quality*. *J. Food Sci.* 42:1-6.
- Regalado-González, C., Duarte-Vázquez, M.A., García-Armendárez, B. 1998. Purification and characterization of Brussels sprouts and turnip peroxidases. IFT Annual Meeting.
- Rhodes, J.M. y Woollorton, S.C. 1978. The biosynthesis of phenolic compounds in wounded plant storage tissues. En *Biochemistry of wounded plant tissues*. (Kahl, G., ed.) Walter de Gruyter. Berlin. p 1, 243,
- Richard-Forget, F.C. y Gaillard, F.A.. 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2472-2476.
- Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. En *Copper proteins and copper enzymes*. Lontie, R. (Ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida. p. 207-241.
- Robinson, D.S. 1991. Peroxidases and catalases in foods. En *Oxidative enzymes in Foods*. Robinson, D.S. y Eskin, N.A.M. (Eds.). Elsevier Applied Science. p. 1-47.
- Rolle, R.S. y Chism, G.W. 1987. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. *J. Food Quality* 10: 57-117.
- Rossen, J.C. y Kader, A.A. 1989. Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *J. Food Sci.* 54: 656-659.
- Rubatzky, V. y Yamaguchi, M. 1997. *World Vegetables: Principles, Production, and Nutritive Values*. Chapman & Hall. 2ª ed. USA.
- SAGARH. 1999. *Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos*. México.
- Saltveit, M. 1998. Fresh-cut product biology. En *Fresh-Cut Products: Maintaining Quality and Safety* UC Davis Postharvest Hort. Series No. 10.
- Sato, Y. 2001. Spatial and temporal regulation of lignification during tracheary element differentiation. En *Molecular Breeding of woody plants*. Morohoshi, N. y Komamine, A. (Eds.). Elsevier. The Netherlands. p. 19-28.
- Scalbert, A. y Monties, B. 1986. Composition of wheat straw lignin preparations. *Holzforschung*. 40:249-254.

- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., Guittet, E. y Rolando, C. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*. 24(6):1359-1362.
- Singleton, V.L. y Rossi, J. A., Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-158.
- Sørensen, M. 1996. Yam bean (*Pachyrhizus* DC.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 2. Inst. Plant Genetics and Crop Plant Research, 140 pp. Gatersleben/Intl. Plant Genetic Resources Inst., Rome.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. En *Plant Biochemistry*. Dey, P.M. y Harborne, J.B.(Eds.). Academic Press. USA.
- Sun, R., Lawther, J.M. y Banks, W.B 1996. Effects of extraction time and different alkalis on the composition of alkali-soluble wheat straw lignins. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3965-3970.
- Sun, R., Lawther, J.M. y Banks, W.B. 1995. Influence of alkaline pre-treatments on the wall components of wheat straw. *Ind. Crops Products*. 4: 127-145
- Tanaka, Y. y Uritani, I. 1977. Polarity of production of polyphenols and development of various enzyme activities in cut-injured sweet potato root tissue. *Plant Physiol.* 60:563-566.
- Terashima, N., Atalla, R.H., Ralph, S.A., Landucci, L.L., Lapierre, C. y Monties, B. 1996. New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate cell wall lignification: II. Structural characterization of the models by thioacidolysis. *Holzforschung*. 50: 9-14.
- Thomas, P. y Delincée, H. 1979. Effect of gamma irradiation on peroxidase isoenzymes during suberization of wounded potato tubers. *Phytochemistry*. 18: 917-921.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B. y Robinson, S.P. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
- Uritani, I. 1999. Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:177-183.
- Uritani, I. y Oba, K. 1978. The tissue slice system as a model for studies of host-parasite relationships. En *Biochemistry of wounded plant tissues*. Kahl, G. (Ed). Walter de Gruyter & Co. Berlin-New York. P. 287.

- USDA. 1993. United States Department of Agriculture. Fresh-cut produce. Shipping point and market inspections instructions for fresh-cut produce. Washington, D.C. General inspections instructions.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Vance, C.P., Kirk, T.K. y Sherwood, R.T. 1980. Lignification as mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 259-288.
- Varoquaux, P., Lecendre, I., Varoquaux, F. y Souty, M. 1990. Change in firmness of kiwi fruit after slicing. *Sci. Alim.* 10: 127-139.
- Wang, Z. y Luh, B.S. 1983. Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J. Food Sci.* 48: 1412-1417.
- Watada, A.E., Abe, K. y Yamaguchi, N. 1990. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Tech.* 44(5): 116-122.
- Watada, A.E., Ko, N. y Minott, D. 1996. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharv. Biol. Tech.* 9: 115-125.
- Whetten, R.W., MacKay, J.J. y Sederoff, R.R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 49: 585-606.
- Whetten, R.W. y Sederoff, R.R. 1995. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 1001-1013.
- Xiaodong, Z. y Flurkey, W. 1997. Phenoloxidases in portabella mushrooms. *J. Food Sci.* 62(1): 97-100.
- Ye, Z.H. y Varnes, J.E. 1995. Differential expression of two O-methyl transferases in lignin Biosynthesis in *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 108: 459-467.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. y Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. En *Oxidative enzymes in foods*. Robinson, D.S. y Eskin, N.A.M. (Eds.). Elsevier Applied Science. England. pp. 217-273.
- Zohng, R., Morrison III, W.H., Negrel, J. y Ye, Z.H. 1998. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell.* (10): 2033-2045.
- Zhou, P., Smith, N.L. y Lee, C.Y. 1993. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 41:532-536.

## 10. APÉNDICE

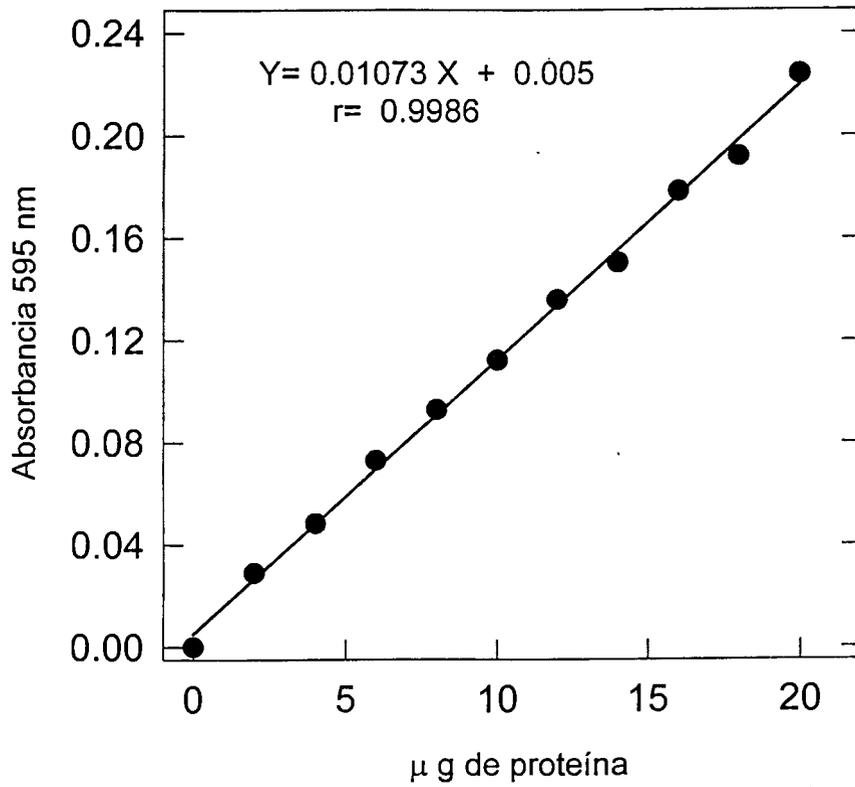


Figura A1. Curva de calibración para calcular el contenido de proteína utilizando el método de Bradford (1976).

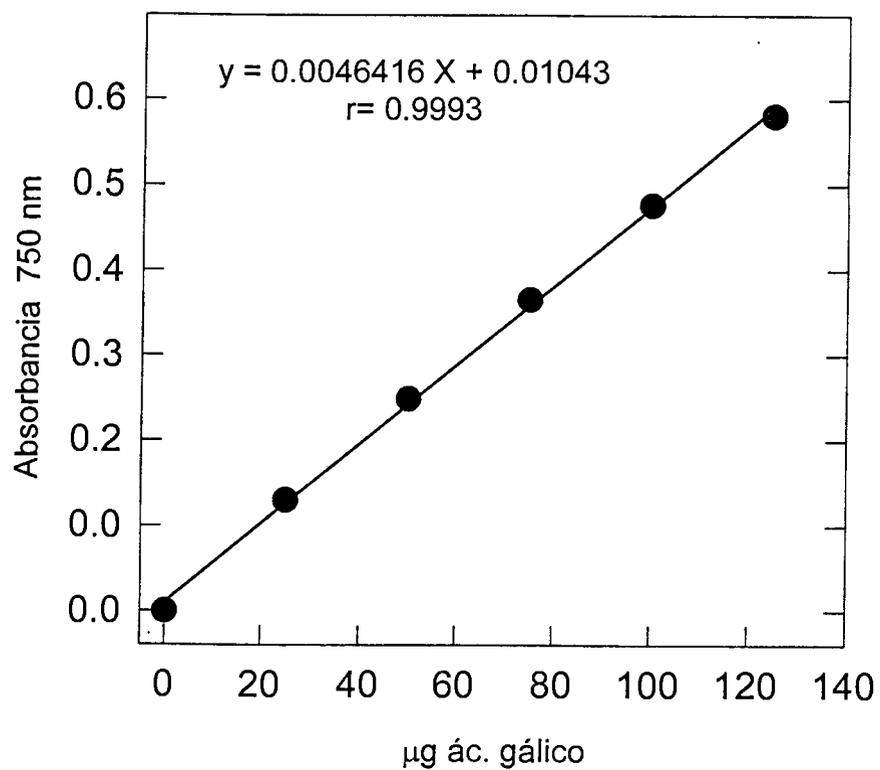


Figura A2. Curva de calibración para calcular la concentración de fenoles totales utilizando el método de Singleton y Rossi (1965).

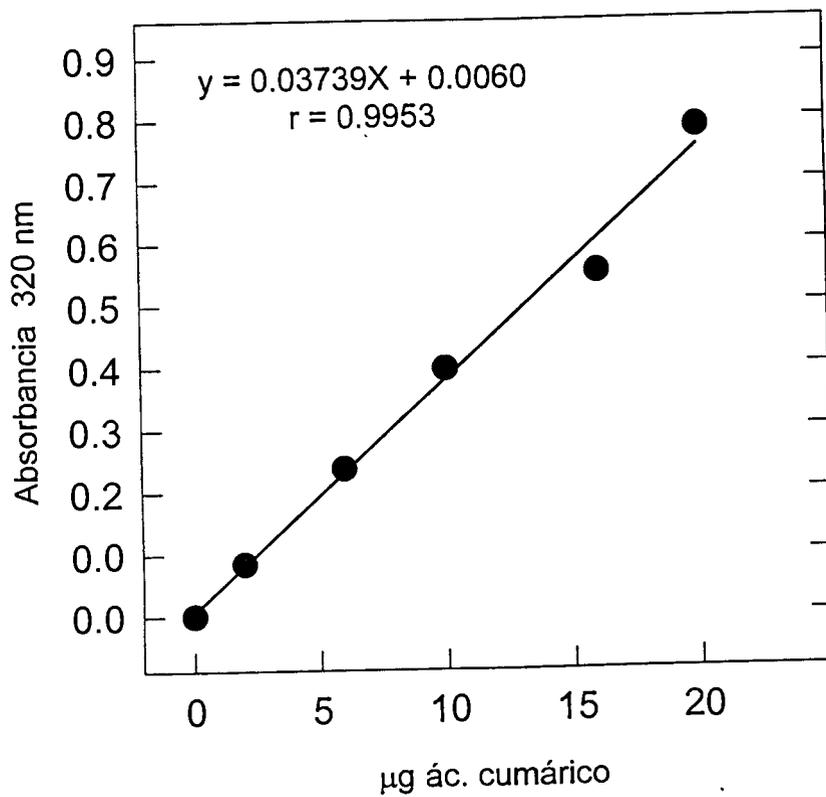


Figura A3. Curva de calibración para calcular el contenido total de ligninas por el método de Ketsa y Atantee (1998).