

**INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIFENOL
OXIDASA EXTRAÍDA DEL BANANO (*Cavendish valery*) MEDIANTE
SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS CON ISOESPINTANOL Y ÁCIDO
ASCÓRBICO**

CARLOS ARTURO GUERRERO ERASO

**Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de
Alimentos**

Dirigido por:

BENJAMIN ALBERTO ROJANO

PhD Ciencias Químicas

MSc.Ciencia de los Alimentos

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, SEDE MEDELLÍN

MEDELLÍN, 2009

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, 23 de junio de 2009

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a mi director de tesis Benjamin Alberto Rojano por su apoyo, dedicación y confianza, a mi compañera y amiga Andrea Gil y a la estudiante de Ingeniería Química Dania Vidales por su valiosa colaboración durante la investigación.

Quiero agradecer a los laboratorios y a las personas que directa e indirectamente me colaboraron durante la investigación:

Profesor Jorge A. Correa Quiroz. Director de La Escuela de Química

Profesor Jairo Quijano Tobón. Director Laboratorio de Fisicoquímica Orgánica

Profesor Orlando Ruiz. Director del Laboratorio de Suelos

Profesora María del Socorro Hernández. Directora del Laboratorio de Micotoxinas

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO 1	48
Inhibición de la Actividad Enzimática de la Polifenol Oxidasa extraída del banano (<i>Cavendish valery</i>) mediante sistemas Bifásicos Acuoso con Isoespintanol y ácido ascórbico.	
RESUMEN	48
ABSTRACT	49
INTRODUCCIÓN	50
MATERIALES Y MÉTODOS	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN.....	76
ANEXO	86

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Constante cinética, Km, para la reacción de la PPO con diferentes sustratos.....	20
Tabla 2. Condiciones óptimas de extracción de la PPO.....	21
Tabla 3. Técnicas de purificación según la característica del material biológico	27
Tabla 4. Sustancias comunes para la formación de los sistemas bifásicos acuosos.....	38

CAPITULO 1

Tabla 1. Variables Independientes codificadas y naturales usadas para la generación del diseño experimental central compuesto	56
Tabla 2. Combinaciones posibles de isoespintanol (ISO) y ácido ascórbico (A.A.) para el diseño experimental central compuesto.	57
Tabla 3. Características fisicoquímicas del banano variedad <i>Cavendish valery</i>	57
Tabla 4. Efecto del sistema PEG/fosfatos sobre la distribución de la enzima en el sistema.....	59
Tabla 5. Purificación parcial de la PPO.....	60
Tabla 6. Inhibición de la actividad enzimática de la PPO con Isoespintanol y Ácido Ascórbico.	62
Tabla 7. Valores medios de la actividad y porcentaje de inhibición de la PPO.....	63
Tabla 8. Valores medios de isoespintanol y ácido ascórbico respecto al ΔE^*	64
Tabla 9. Análisis de Varianza de la inhibición de la PPO	65

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCION

Figura 1. Reacción generalizada de la PPO en plantas.....	15
Figura 2. Geometría de los centros activos de la PPO.....	16
Figura 3. Mecanismo cinético propuesto para la oxidación de O-difenol (Catecol [A]) y un monofenol (fenol [B])	17
Figura 4. Estructura de algunos sustratos naturales de la PPO.....	19
Figura 5. Diagrama de flujo para la extracción y purificación parcial de la PPO mediante Sistemas Bifásicos Acuosaos	30
Figura 6. Estructura química del Isoespintanol	32
Figura 7. Estructura química del Timol.....	33
Figura 8. Estructura química del ácido ascórbico.....	34
Figura 9. Secuencia fotográfica del fenómeno de formación de fases del sistema PEG/Dx.....	39
Figura 10. Espacio de color CIELAB	44

CAPITULO 1

Figura 1. Gráfico del doble recíproco ($1/V$ versus $1/[S]$) para la enzima en presencia de isoespintanol	61
Figura 2. Efecto de la concentración de los inhibidores sobre la actividad de la PPO y el porcentaje de inhibición.....	63
Figura 3. Variación de ΔE^* en el tiempo a 505,8 ppm de isoespintanol y 1380 ppm de ácido asórbico.....	64
Figura 4. Reacción postulada para explicar la anulación de la sinergia entre el isoespintanol y el ácido ascórbico.	66
Figura 5. Efectos de los factores (Ácido ascórbico e Isoespintanol) en ΔE^* y Actividad enzimática.	67
Figura 6. Superficies de respuesta que relaciona ISO y AA con ΔE^* y actividad enzimática.....	68
Figura 7. Superficie de respuesta para la conveniencia entre ΔE^* y actividad enzimática.....	68

LISTA DE ECUACIONES

INTRODUCCIÓN

Ecuación 1. Coeficiente de distribución para la enzima.....	40
Ecuación 2. Relación del soluto en las dos fases.....	40
Ecuación 3. Cambio de color normalizado ΔE^*	44
Ecuación 4. Índice de pardeamiento	46

CAPITULO 1

Ecuación 1. Cambio de color normalizado.....	55
Ecuación 2. Constante de distribución de la enzima	58
Ecuación 3. Constante de distribución de la proteína.....	58
Ecuación 4. Factor de purificación	58
Ecuación 5. Porcentaje de rendimiento en la fase superior	58
Ecuación 6. Relacion de volumen en la fase superior y fase inferior del sistema	58

RESUMEN

La Polifenol oxidasa, PPO, es una de las enzimas más estudiadas en la industria de los alimentos ya que es la responsable de las reacciones de pardeamiento enzimático en frutas y verduras. Una de las razones por las cuales es importante su estudio es por que comercialmente es indeseable, ya que modifica las propiedades sensoriales, nutricionales y en general de calidad que perjudica la comercialización de un producto.

El banano que pertenece al género Musa, con sus innumerables variedades, es una fruta tropical de importancia comercial que sufre cambios en su textura, color a través del proceso de maduración. Los cambios asociados a la maduración como bioquímicos, fisiológicos y de composición y el ablandamiento de los plátanos se han estudiado y reportado ampliamente durante las distintas fases de desarrollo en las cuales la polifenol oxidasa cumple un papel importante.

La extracción utilizando sistemas bifásicos acuosos es una técnica ampliamente utilizada en biotecnología como método de recuperación o purificación de material biológico. La formación de dos fases inmiscibles se lleva a cabo cuando se mezclan dos polímeros o un polímero y una sal en agua. La distribución en equilibrio de la proteína en el ATPS no solo depende de las propiedades de superficie sino también de las propiedades fisicoquímicas de las dos fases. Este trabajo describe la técnica de extracción de la Polifenol Oxidasa de la pulpa de banano mediante ATPS. El sistema bifásico está compuesto de Polietilenglicol de peso molecular 8000 y fosfato (PEG 8000/fosfato). La concentración de los componentes del sistema es PEG 5% p/p, fosfatos 28.5% p/p, agua 56.5% p/p y extracto enzimático 10% p/p. El pH del sistema es de 7.0 a 25°C. Se obtuvo un K_a de 23, un factor de purificación de 12.99 y un 82.14% de rendimiento de la actividad de la enzima en la fase superior utilizando dopamina como sustrato.

La enzima oxida rápidamente dopamina, obteniendo un valor K_m de 0,01534 M, una $V_{m\acute{a}x}$ de 0,1035(M/min) y una relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ 6.74 min^{-1} . La temperatura óptima de la enzima es de 30 ° C y su actividad fue inhibida por el ácido ascórbico y Isoespintanol.

Isoespintanol (2-Isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es un compuesto aislado de la planta *Oxandra cf xylopioides* que ha sido estudiado utilizando diferentes modelos experimentales diseñados para evaluar propiedades antioxidantes. Los resultados indican que el isoespintanol es mejor agente reductor que el butil hidroxil tolueno (BHT) en el ensayo FRAP.

El isoespintanol y el ácido ascórbico actúan como inhibidores de pardeamiento enzimático arrojando una constante de inhibición de 0,03906 para el isoespintanol.

ABSTRACT

Polyphenol oxidase, PPO, is currently the most studied enzyme concerned with the enzymatic browning in fruits and vegetables. One reason for this attention by food engineering is that browning is commercially undesirable because it impairs the sensory properties and, hence, marketability of a product.

The banana belongs to the genus *Musa* of the family *Musaceae*. Banana, with its innumerable varieties, is a tropical fruit of commercial significance and undergoes textural and color transformations as they pass through the ripening process. Biochemical, physiological and compositional changes associated with ripening and resulting softening of bananas have been reviewed extensively and reported on the chemical changes in the banana fruit during different development stages.

Aqueous two-phase system extraction (ATPS) has been widely used in biotechnology to recovery and purification of biological material. Two immiscible phases are formed when two polymers or polymers and salt solution are mixed. Protein equilibrium distribution in ATPS depends not only on its own surface properties but also on the physicochemical properties of the two phases. This paper describes the extraction technique of polyphenol oxidase from banana pulp through ATPS. The system contains polyethylene glycol, molecular weight 8000 and phosphate (PEG 8000/phosphate). The concentration of phase forming components are polyethylene glycol 5%, w/w, phosphate 28.5% w/w, water 56.5% w/w, and enzymatic extract 10% w/w. The pH system is 7.0 at 25°C. The results show a 23 for K_a value, purification factor of 12.99 and 82.14% yield of enzyme activity in the top phase, using dopamine as substrate. The enzyme quickly oxidized dopamine, and its K_m value for dopamine was 0,01534M, $V_{m\acute{a}x}$ 0,1035(M/min) and $V_{m\acute{a}x}/K_m$

6.74 min⁻¹. The enzyme had an optimum temperature of 30°C and the enzyme activity was inhibited by ascorbic acid and Isoespintanol.

Isoespintanol (2-Isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) was isolated from *Oxandra cf xylopioides* and studied using different experimental models designed to assess antioxidant properties. The results indicated that isoespintanol is better reducing than BHT in the FRAP assay.

The isoespintanol and ascorbic acid act as inhibitors of enzymatic browning with an inhibition constant 0.03906.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 INTERÉS DEL ESTUDIO

La importancia del control de la polifenol oxidasa radica en que determina en gran medida la calidad y valor económico de las frutas y vegetales cosechados, almacenados y procesados. Las magulladuras, el troceado y otros procedimientos mecánicos dañan las paredes de las frutas y vegetales lo cual permite que el oxígeno penetre, dando como resultado el oscurecimiento o las reacciones pardeamiento enzimático.

El interés de la presente investigación se desprende del estudio de nuevas fuentes de compuestos naturales que contengan actividad antioxidante que permitan el control de las reacciones de pardeamiento enzimático en frutas o vegetales mínimamente procesados. Se han encontrado una amplia variedad de plantas fenólicas que contienen compuestos con alto poder protector sobre el pardeamiento enzimático, uno de esos compuestos naturales es el isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) que es un monofenol extraído del extracto etéreo de las hojas de *Oxandra* cf. *xylopioides*, *Annonaceae*, (Rojano 2008). Los mono y polifenoles se han reportado como estructuras antioxidantes debido a la capacidad captadora de protones y a su capacidad reductora, el isoespintanol y el ácido ascórbico, ha sido estudiados como antioxidantes en diferentes medios (Rojano 2008, Franck 2003)

Debido al porcentaje tan alto encontrado para un producto natural como el isoespintanol (1.5%) y sus características estructurales adecuadas como antioxidante promisorio para usar en diferentes medios; en este trabajo, se estudió la inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa por medio del isoespintanol y el ácido ascórbico.

La actividad antioxidante del isoespintanol ha sido estudiada mediante diferentes técnicas: FRAP, ABTS y DPPH comparándolo con el butil hidroxitolueno (BHT), el cual es el antioxidante sintético más utilizado en la industria de los alimentos, concluyendo que el isoespintanol es mejor reductor que el BHT en sistemas emulsificados (Rojano 2008). De tal manera, que para comprender la capacidad antioxidante de una estructura química es necesario evaluarla en diferentes medios para decidir sobre su posible uso. Esto conlleva a medir el efecto inhibitorio del Isoespintanol, ácido ascórbico y sus combinaciones sobre la actividad de la Polifenol Oxidasa parcialmente purificada. La enzima polifenol oxidasa fue extraída del banano mediante un sistema bifásico acuoso; el cual permite, además de su extracción, realizar una purificación parcial de la misma, logrando obtener una buena actividad enzimática evitando interferencias con otro material biológico en los extractos crudos.

Las reacciones de pardeamiento enzimático en frutas y vegetales impresionan negativamente a los consumidores debido a la asociación que hacen entre el color y su calidad nutricional. El color de un alimento es un indicador de calidad; cuando una fruta presenta colores oscuros, es porque han ocurrido reacciones químicas que le modifican organoléptica y nutricionalmente; razones por las cuales no son consumidos (Lee 2007). Por lo tanto, en este trabajo se evaluará el cambio de color como parámetro útil para determinar el comportamiento inhibitorio de la PPO ocasionado por el isoespintanol y el ácido ascórbico, en pulpa de banano.

El proyecto, “inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (*Cavendish valery*) mediante sistemas bifásicos acuosos por medio del isoespintanol y ácido ascórbico” contribuye con el estudio de nuevas alternativas en conservación de alimentos con

aditivos naturales, especialmente, en frutas y hortalizas evitando las reacciones de pardeamiento que generan una pérdida enorme en los procesos agroalimentarios.

2. ESTADO DEL ARTE

Iniciaremos describiendo los apartes más importantes de la polifenol oxidasa; seguido de una descripción de la capacidad antioxidante del isoespintanol, en estudios anteriores y finalmente una explicación de las bondades de la técnica de extracción de sistemas bifasicos acuosos.

2.1 POLIFENOL OXIDASA (PPO)

La Comisión de Enzimas (EC) clasifica la polifenol oxidasa, con el número 1.10.3.1. dentro de la clase de las Oxidoreductasas, actuando sobre difenoles con oxígeno como aceptor (Nevin-Ridley 2009). La polifenoloxidasa conocida como tirosinasa, fenolasa, catecol oxidasa, *o*-difenoloxidasa, monofenol oxidasa cresolasa, fue descubierta y aislada inicialmente de champiñones; ella actúa sobre dos tipos de sustratos: monohidroxifenoles como por ejemplo el *p*-cresol hidroxilandolos en posición orto con respecto al grupo hidroxilo original, EC 1.14.18.1, y sobre *o*-dihidroxifenoles tales como el catecol, oxidándolos a benzoquinona por remoción de hidrógenos del grupo hidroxilo, EC 1.10.3.1. (Ramirez *et al.*2003). La figura 1 muestra las dos actividades que ella presenta.

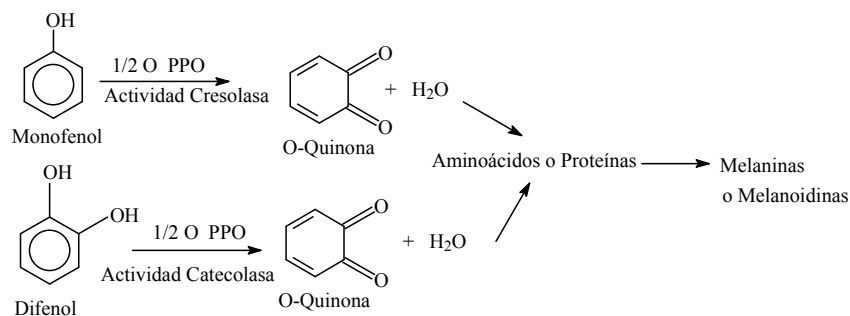


Figura 1. Reacción generalizada de la PPO en plantas. *Fuente:* Gacche *et al.* (2003).

La característica estructural más importante de la PPO es la presencia en su centro activo de dos átomos de cobre, unidos a histidinas; alrededor de los cobres, se sitúan aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos importantes para la unión de los sustratos (Calvo 2007). Los sitios activos muestran una estructura piramidal trigonal coordinadas por las esferas formadas por los tres ligandos de histidina y la molécula del solvente como puente. El átomo de azufre de la cisteína 92 no se liga al centro del cobre pero está unido covalentemente al átomo del carbono de la histidina 109, ver figura 2 (Klabunde *et al.* 1998).

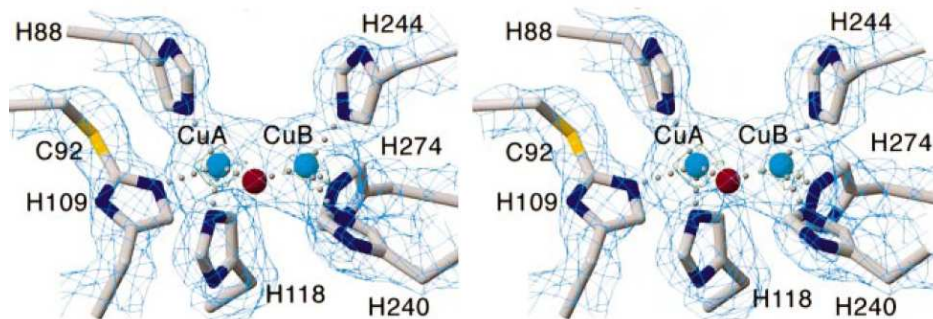


Figura 2. Geometría de los centros activos de la PPO. *Fuente:* Klabunde *et al.* (1998).

El mecanismo de reacción de la PPO, ver figura 3, se basa en la catálisis de dos etapas: oxidación de un monofenol a *o*-difenol y la subsiguiente oxidación de éste a *o*-quinona, actividad cresolasa y catecolasa respectivamente. Siguiendo un mecanismo ordenado, la enzima liga primero el oxígeno y después el monofenol. Se produce un cambio de valencia de los iones de cobre de Cu^{1+} a Cu^{2+} formándose un complejo que tiene un enlace O - O bien polarizado donde se produce la hidroxilación a *o*-difenilo. La oxidación del *o*-difenol a *o*-quinona finaliza el ciclo (Belitz & Grsosh 1997). La polifenol oxidasa es capaz de catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular y la presencia de los compuestos oxidados por la enzima son precursores de las reacciones de pardeamiento que ocurren en los procesos de pos-recolección y manipulación de frutas y hortalizas (Ayaz *et al.* 2007).

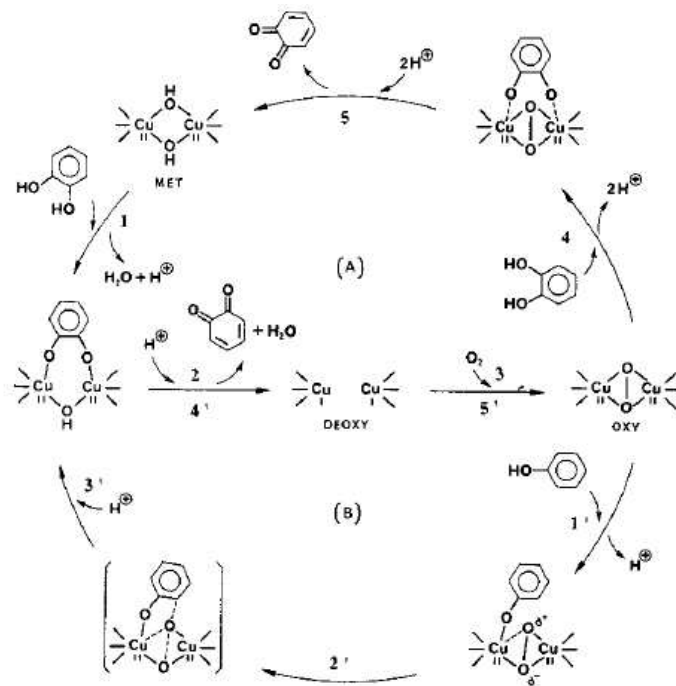


Figura 3. Mecanismo cinético propuesto para la oxidación de *o*-difeno (catecol [A]) y un monofenol (fenol [B]). *Fuente:* Ramirez *et al.* (2003)

Las estadísticas reportan que las pérdidas poscosecha de cereales en los países en desarrollo, debido a la manipulación inadecuada, el deterioro y el ataque de plagas, oscilan en un 25%. Las frutas, las hortalizas, las raíces y los tubérculos son mucho menos resistentes y, en su mayor parte, perecederos, por lo que, si no se controla su cosecha, manipulación y transporte, se deterioran rápidamente. Las reacciones de pardeamiento enzimático en los vegetales, se cree que desempeñan importantes funciones fisiológicas en la prevención al ataque de insectos y microorganismos o como respuesta a las heridas ocasionadas en los tejidos vegetales como magulladuras (Marshall *et al.* 2000).

2.1.1 INHIBICION DE LA PPO (PPO)

Los primeros estudios sobre la PPO en banano los realizó James K. Palmer para la United Fruit Co. publicados en *Plant Physiology* en 1961. En este trabajo plantea algunas propiedades de la PPO y las compara con otras fuentes vegetales de esta enzima. A partir de este momento, se desprenden gran cantidad de investigaciones explorando la manera de cómo inhibir el pardeamiento, especialmente, en frutas y hortalizas. Palmer en 1961, evalúa varios tipos de sustratos, ver figura 4, para determinar la actividad enzimática en mono o difenoles, como por ejemplo dopamina, ácido clorogénico, catecol, dopa, entre otros (Palmer 1961), se han utilizado sustancias como ácido ascórbico, ácido cítrico, cloruro de sodio (Pizzocaro *et al.* 1993, Lu *et al.* 2007), cisteína, 4-hexilresorcinol (Guerrero *et al.* 2004). Buscando otras alternativas se han usado de sulfitos, tioles (Friedman & Bautista 1995), cuminaldehído (Kubo & Kinst-Hori 1998), extractos vegetales y técnicas combinadas como atmósferas controladas, ácido ascórbico y EDTA (Lee 2007; Soliva-Fortuny *et al.* 2002), adición de sustancias químicas (Klapp *et al.* 1990, Jimenez & García-Carmona 1996, Dawley & Flurkey 1993), ajustando las condiciones de pH (Wesche-Ebeling 1990), por exclusión de oxígeno (Paulson 1990), y aplicando métodos físicos como la refrigeración y procesos térmicos además de tecnologías emergentes como los campos eléctricos pulsados, altas presiones hidrostáticas, rayos Gamma (Queiroz *et al.* 2008, Oh *et al.* 2005).

Los tratamientos por calor o frío para la inhibición de enzimas causan sobre las frutas y hortalizas efectos adversos tales como la pérdida de color, alteraciones en su sabor, olor y pérdida de su valor nutricional (Alzamora *et al.* 2004).

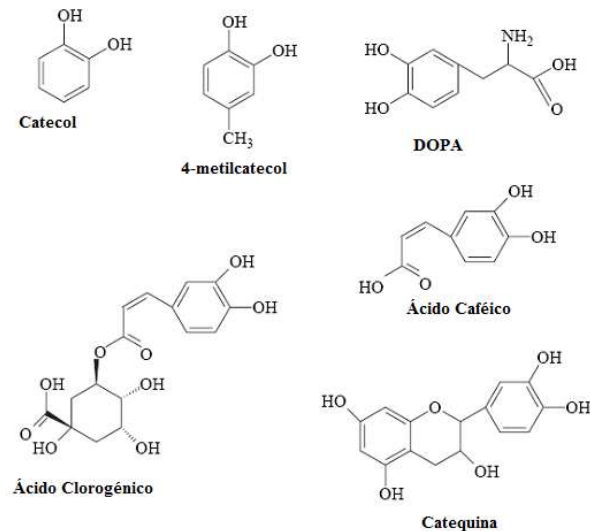


Figura 4 Estructura de algunos sustratos naturales de la PPO. *Fuente: Queiroz et al.(2008).*

El pardeamiento enzimático puede ser controlado a través del uso de métodos químicos y físicos, a menudo empleados en combinación. Los métodos físicos comúnmente utilizados son la reducción de la temperatura, el oxígeno y el uso de atmósferas modificadas o películas de recubrimiento. La utilización de los métodos químicos dependerá de lo que se desee inhibir, ya sea la enzima, el sustrato (oxígeno o compuestos fenólicos) o los productos.

En banano, (*Musa acuminata*), las reacciones de pardeamiento resultan de la oxidación enzimática de la dopamina (3,4 dihidroxi fenil etil amina) por la PPO, su máxima actividad se obtiene a un pH de 7.0. Esto significa que la dopamina es el sustrato mas reactivo para la PPO en comparación con otros sustratos, como por ejemplo: la D y L dopa, catecol y ácido clorogénico los cuales presentan valores de K_m , constantes cinéticas, que varían desde 6.3×10^{-4} hasta 3×10^{-2} M (Palmer 1961).

La tabla 1 muestra la variación de la constante cinética, Km, respecto al sustrato utilizado.

Tabla 1. Constante cinética, Km, para la reacción de la PPO con diferentes sustratos. *Fuente:* Palmer (1961).

<i>Sustrato</i>	<i>Km (M)</i>
Dopamina	6.3×10^{-4}
D,L-arterenol	2.4×10^{-3}
L-arterenol	3.6×10^{-3}
D,L Dopa	4.4×10^{-2}
L-Dopa	6.6×10^{-2}
D-Dopa	3.0×10^{-2}
Catecol	2.6×10^{-3}
Acido Clorogénico	4.0×10^{-3}

Estudios mas recientes demuestran que en el banano (*Musa cavendishii*), la temperatura óptima para evaluar su actividad es de 30°C a un pH de 7.0; el ácido ascórbico y el metasulfito de sodio, como inhibidores presentaron mayor efectividad y se obtuvieron valor de Km y Vmax. de 8.5 mM y 0,754 OD₄₁₀ min⁻¹ (Ünal 2007).

Lee en 2007, reporta que el ácido ascórbico y el metabisulfito siguen siendo las sustancias con mayor efectividad para inhibir el pardeamiento enzimático en comparación con el ácido cítrico, sorbato de potasio y cloruro de sodio (Lee 2007). Wuyts (2006), estudiando la polifenol oxidasa extraída del banano (*Musa acuminata*), reporta que la máxima actividad la obtuvo a pH 7.0 ajustado con buffer fosfato 0.2M. Los valores más bajos de Km, 0.6 y 1.2, fueron obtenidos para la dopamina y *d*- catequina respectivamente y su actividad fue estudiada utilizando una concentración de sustrato de 3 mM; el metabisulfito de sodio y el ditiotreitól fueron los inhibidores mas efectivos en el control de pardeamiento (Wuyts *et al.*2006). M. Mar Sojo (1998) y su grupo, realizando purificaciones a partir de la pulpa de banana (*Musa acuminata*) subgrupo Cavendish variedad Spanish Pequeña Enana de la PPO, encuentran la actividad máxima a un pH de 5.5 utilizando 10 mM de acetato de sodio. Los parámetros cinéticos Vmax y Km se llevaron

acabo a un pH de 6.5 utilizando como sustrato dopamina obteniendo 7.3 y 0,57 mM respectivamente. Ácido ascórbico, *l*-cisteína y metabisulfito de sodio siguen presentando mayor efectividad en el control de pardeamiento (Sojo *et al.*1998). Así, encontramos estudios, para el control del pardeamiento enzimático en aguacate, manzano, fresa; tubérculos como papa, yuca y en algunos vegetales (Espin 1996; Montero *et al.* 2001; Nilo 2006; Espin *et al.*1997; Delicado-Nuñez *et al.*2007; Chazarra *et al.*1996), ver tabla 2.

Tabla 2 Condiciones óptimas de extracción de la PPO. *Fuente:* Queiroz *et al.* (2008).

Fuente	Sustrato con alta afinidad	Km (mM)	pH óptimo	Temperatura óptima
Manzana	4-metilcatecol	3.1	7.0	15
	Catecol	34.0		
Alcachofa	Catecol	10.2	6.0	25
	4-metilcatecol	12.4		
Berenjenas	Catecol	8.7	7.0	20
Banano (cv. Anamur)	Catecol	8.5	7.0	30
Uva (cv. Victoria)	Ácido clorogénico	3.2	5.0	25
	Catequina	4.3		
Nispero	Ácido clorogénico	1.0	6.5	30
	4-tercatecol	1.2		
Mango (cv. Tainong)	Catecol	6.3	7.0	30
	Pirogalol	47.8		
Mora	Pirogalol	1,2	7.5	20
	4-metilcatecol	9.2		
	Catecol	19.8		
Pimienta	Catecol	6.3	7.0	30
Fresa (cv. Elsanta)	Catecol	5.9	5.0	25

2.1.2. INHIBIDORES ENZIMATICOS DE LA POLFENOL OXIDASA

2.1.2.1 Agentes reductores. Previenen el pardeamiento enzimático por la reducción de *o*-quinonas a *o*-difenoles no coloreados. Los compuestos derivados del azufre son los más ampliamente empleados en la industria de los alimentos. Ejemplo el bisulfito (HSO_3^-) y sulfitos (SO_3^{2-}) (Marshall *et al.* 2007). En esta clasificación también encontramos al ácido ascórbico y la cisteína, la cual tiene efectos negativos sobre el sabor (Amiot 1997).

2.1.2.2 Acidulantes. Los acidulantes son aplicados generalmente para mantener el pH por debajo del punto óptimo de actividad catalítica de la enzima. Acidulantes como el ácido cítrico, málico y fosfórico pueden inhibir el efecto de la PPO. Los acidulantes son usados frecuentemente con otros antioxidantes.

2.1.2.3 Quelantes. Las enzimas generalmente poseen iones de metales en su sitio activo. Los agentes quelantes remueven estos iones inactivando a la enzima. Tanto los complejos formados entre los agentes quelantes y los prooxidantes tales como el cobre o el hierro, son inhibidores.

2.1.2.4 Agentes acomplejantes. La más importante propiedad funcional de la ciclodextrina como agente acomplejante es su habilidad para la inclusión de moléculas dentro del núcleo hidrofóbico o ligeramente apolar, convirtiéndose en un excelente inhibidor de pardeamiento en frutas frescas y vegetales crudos (Hicks *et al.* 1990; Otwell *et al.* 1992).

Una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos, como los mencionados anteriormente, tienen la capacidad de unirse reversible e irreversiblemente a enzimas específicas y alterar su actividad. Los inhibidores competitivos, no competitivos e incompetitivos son reversibles.

2.1.2.5 Inhibidores de enzimas. El 4-hexilresorcinol, es un compuesto *m*-difenólico que está estructuralmente relacionado con los sustratos fenólicos, tienen un efecto inhibidor competitivo

con la PPO (Otwell *et al.* 1992; Mc-Evily *et al.* 1991). La actividad de la monofenolasa y difenolasa de la tirosinasa son inhibidas por el 4-HR. Este es efectivo a bajas concentraciones, tiene estabilidad química, y presenta alto sinergismo con el ácido ascórbico mientras reduce las quinonas (Guerrero *et al.* 2004).

2.1.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA

Estudios en enzimología afirman que las investigaciones detalladas de cómo una enzima cataliza la conversión de una sustancia en otra es en general una pérdida de tiempo, si la enzima no ha sido parcialmente purificada (Kornberg 1990). La mezcla de diferentes enzimas liberadas de un extracto crudo, que contiene varios reordenamientos del material de partida y el producto en particular, hacen que la acción de la enzima se vea afectada. La purificación de la enzima asegura que un solo tipo de enzima dirige la conversión de una sustancia A a B; de esta forma, se puede aprender, cómo la enzima hace su trabajo (Kornberg 1990). En las plantas, los polifenoles se encuentran localizados principalmente en las vacuolas y su oxidación es catalizada por la enzima Polifenol Oxidasa, que se encuentra en el citoplasma (Hammer 1993; Ono *et al.* 2006); por esto, los procesos de extracción de la PPO del tejido vegetal presentan algunos aspectos a considerar, como por ejemplo, la resistencia de la pared celular, debido a la presencia de celulosa. Debido a que las vacuolas ocupan gran parte del volumen total de la célula; cuando éstas, son destruidas liberan proteasas al medio, lo cual, hace que el pH del medio disminuya y la enzima se inactive; adicionalmente, los compuestos fenólicos en la célula reaccionan con el oxígeno en presencia de la PPO formando pigmentos poliméricos. Para minimizar estos efectos es usual adicionar agentes reductores como el 2-mercaptoetanol para inhibir las PPO o adicionar polímeros como la polivinilpirrolidona para adsorber los compuestos fenólicos (Price & Stevens 2001).

En la mayoría de los métodos de extracción se involucra el control del pH utilizando soluciones amortiguadoras y para la solubilización de las membranas celulares y el fraccionamiento de las proteínas, para lograr la separación, se utilizan surfactantes no iónicos, como Triton X-114, Triton X-100 (Neugebaue 1990). Los agentes precipitantes como acetona o sulfato de amonio permiten separar la proteína en una primera fase de purificación. Posteriormente se utilizan técnicas de separación como la centrifugación las cuales se deben llevar a cabo a bajas temperaturas (Harding & Rowe 1996).

Durante los procesos de destrucción de los tejidos vegetales la enzima puede disminuir su actividad o llegar a perderla. Para evitar esto hay que diseñar estrategias de extracción con el fin de proteger su actividad como trabajar a bajas temperaturas, evitar el contacto directo del material de extracción con los dedos mediante el uso de guantes, centrifugar a bajas temperaturas el tiempo necesario y controlar las fuerzas desarrolladas por la centrífuga.

Control de pH

Muchas enzimas presentan su actividad máxima en estrechos intervalos de pH, la exposición a valores de pH por fuera del intervalo, puede conducir a la pérdida irreversible de actividad. Algunos factores importantes a tener en cuenta al momento de escoger la solución amortiguadora para la extracción de la enzima son los siguientes:

- El intervalo de pH en donde la enzima tendrá su mayor actividad
- La fuerza iónica y la temperatura que pueden afectar la solución buffer.
- La solución no debe afectar la actividad de la enzima ya sea por efectos quelantes o por interferencias en etapas posteriores de purificación.
- La solución buffer no debe interferir con el método de cuantificación. Por ejemplo no debe absorber a la longitud de onda del ensayo (Price & Stevens 2001).

- **Control de temperatura**

Durante los procesos de rompimiento celular la temperatura puede aumentar considerablemente, para evitar esto, es necesario utilizar soluciones refrigerantes o instrumentos que ayuden a disiparla. Lo usual es llevar a cabo los procesos de extracción a 4°C para minimizar los procesos de desnaturalización de la enzima y reducir la actividad de las proteasas (Lowe 1996). Cabe anotar que en algunos casos, la exposición de la enzima a bajas temperaturas puede dar lugar a la inactivación debido a la cristalización del solvente (Price & Stevens 2001).

Control de proteólisis

El control de la degradación de las enzimas por proteínas endógenas durante o después de la extracción es uno de los retos en este tipo de trabajo. La proteólisis puede afectar:

- Un bajo rendimiento en el proceso de extracción
- Inestabilidad de la enzima en procesos de incubación
- Baja resolución en análisis electroforético
- Discrepancias entre los valores observados y los reportados de las proteínas

Algunas estrategias para evitar el fenómeno proteolítico son:

- Bajar la temperatura para inhibir la acción de las proteasas

Adición de inhibidores de proteasas durante la extracción y posteriores etapas como por ejemplo azida de sodio (Price & Stevens 2001).

Protección contra metales pesados

Metales pesados como el plomo, cobre mercurio o zinc pueden inhibir la actividad enzimática debido a la reacción con residuos de aminoácidos como la cisteína. Estos metales pueden surgir de los tejidos vegetales utilizados para la extracción, del material de vidrio sucio, del agua destilada o de los reactivos químicos empleados. La adición de EDTA en el medio de extracción puede minimizar estos efectos. La utilización de agua de alta calidad y reactivos de alta pureza en la preparación de estas soluciones puede minimizar estos efectos (Price & Stevens 2001).

Efectos de la dilución

En la práctica se ha demostrado que las enzimas pierden su actividad rápidamente almacenadas en soluciones diluidas. Este efecto puede ser superado al adicionar una proteína inerte como la BSA (Albúmina de suero bovino) que puede atrapar las proteasas en la superficie, polioles como glicerol, glucosa o sacarosa también son utilizados como agentes hidratantes de la proteína. El glicerol baja el punto de congelación de la solución (Copeland 1996).

2.1.4 PURIFICACIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA

La purificación de la enzima a partir de un extracto crudo depende la característica de la especie a purificar basado en el tamaño, solubilidad, carga, adsorción y afinidad. La tabla 3 muestra la característica que presenta el material biológico a separar y el procedimiento adecuado a seguir.

Es necesario diferenciar entre purificación parcial y total, muchos estudios no ameritan una purificación total de la enzima y por lo tanto solo se requieren unos pocos pasos para purificar parcialmente la enzima. El proceso inicia con la homogenización del extracto ya sea con acetona a -25°C ; o con sulfato de amonio en los diferentes buffers de estudio dependiendo de su actividad

o utilizando algún tipo de detergente o agente quelante como EDTA o PVP (polivinilpirrolidona) (Galeazzi *et al.* 1981).

En el proceso de ruptura de la pared celular y de los tejidos, especialmente las vacuolas para liberar la enzima, es usual utilizar homogenizadores que trabajan a altas velocidades para luego ser precipitadas con sulfatos. Posteriormente, se centrifuga, si se conoce la localización de la proteína en cuestión se puede conseguir la separación de los orgánulos subcelulares mediante centrifugación diferencial.

Tabla 3. Técnicas de purificación según la característica del material biológico *Fuente:*

Característica	Procedimientos
Tamaño	Dialisis - Ultrafiltración Electroforesis en gel Cromatografía de exclusión molecular Ultra centrifugación
Solubilidad	Precipitación con sales Precipitación con solventes orgánicos Precipitación por variación de pH
Polaridad	Cromatografía de adsorción Cromatografía en papel Cromatografía en fase reversa Cromatografía de intercambio hidrofóbico
Carga	Cromatografía de intercambio ionico Electroforesis Isoelectroenfoque
Selectividad	Cromatografía de afinidad

Cuando la proteína deseada se encuentra asociada a una membrana o a un orgánulo membranoso, debe ser extraída en forma soluble, lo cual puede conseguirse, por simple extracción con agua o bien por ruptura mecánica o sónica de las membranas, o mediante el empleo de detergentes para lograr la desintegración de la estructura membranosa (Lehninger 2006).

Las proteínas en disolución experimentan cambios de solubilidad en presencia de sales neutras, de ácidos o de bases y su comportamiento es como de electrólitos cuyo comportamiento se rige por los mismos principios físicos que los electrolitos pequeños, esta propiedad hace que existan diferentes técnicas de purificación basadas en el tamaño molecular, la solubilidad, carga eléctrica, diferencias en sus características de adsorción y su afinidad biológica por otras moléculas.

No existe un procedimiento único o un conjunto de procedimientos mediante los cuales todas y cada una de las proteínas puedan aislarse, normalmente siguen una secuencia de etapas de separación que dará como resultado un grado de purificación elevado y un alto rendimiento. El objetivo es aumentar la pureza o la actividad biológica de la proteína deseada por unidad de peso mediante la eliminación del material inactivo o de las proteínas no deseadas, mientras que al mismo tiempo se consigue un rendimiento máximo (Lehninger 2006).

Una de las técnicas más utilizadas de purificación es la elución de extractos parcialmente purificados, a través de columnas cromatográficas con el buffer de interés. La columna puede estar empacada con Shefadex como fase estacionaria y las fracciones obtenidas serán caracterizadas cinéticamente por medio de técnicas electroforéticas electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato, SDS-PAGE, (Batistuti *et al.* 1985; Yang 2000) .

2.1.5 CARACTERIZACIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA

La caraterización de la PPO de diferentes frutas parte de la extracción con surfactantes, Triton X-114 en un intervalo de pH de 4.0 a 5.5. Estas enzimas, tanto en su forma inactiva como activa, son detectadas mediante SDS-PAGE utilizando DL-Dopa como sustrato (Fraignier *et al.* 1995). Igualmente en café (*Coffea arabica L.*), se han hecho caracterizaciones de la PPO con extractos parcialmente purificados de las hojas como del endospermo. Su actividad máxima se logra a pH comprendidos entre de 6 y 7 a una temperatura de ensayo de 30°C. El sustrato utilizado es el

ácido clorogénico reportando un K_m de 0.882 mM para las hojas y de 2.27 mM para el endospermo de la fruta. La utilización de la filtración en gel y SDS-PAGE permite determinar su peso molecular el cual fue de 67 KDa (Mazzafera & Robinson 2000).

Tres isoenzimas de polifenol oxidasa han sido aisladas de una variedad de pera (*Armutu Ankara*), a través de la precipitación de sulfato de amonio, diálisis y filtración en gel. La muestra obtenida de diálisis después de la precipitación de sulfato de amonio se utiliza para la caracterización de la enzima parcialmente purificada. Para el pirogalol como sustrato se tuvo a un pH óptimo de 8.2; 7.2, para el 4-metilcatecol; 7.0 para el Catecol; 5.6 para la D-tirosina; 5,0 para el *p*-cresol y 4.8 para la L-dopa. La temperatura óptima de PPO fue de 35°C para el 4- metilcatechol. Ácido L-ascórbico, L-cysteina y sodio dietilditiocarbamato fueron los inhibidores más efectivos. Los valores de K_m y V_{max} para la enzima fueron estimados en 5,55 mM y 344,5 UI / ml, respectivamente, para el catecol como sustrato. Sus pesos moleculares se determinaron en 60, 40 y 28 kDa por medio de sodio dodecil sulfato-PAGE (Ziyan & . Pekyardimci 2003).

En la figura 5 se resume una técnica de extracción y purificación parcial de la PPO utilizando Sistemas Bifasicos Acuicosos y surfactantes:

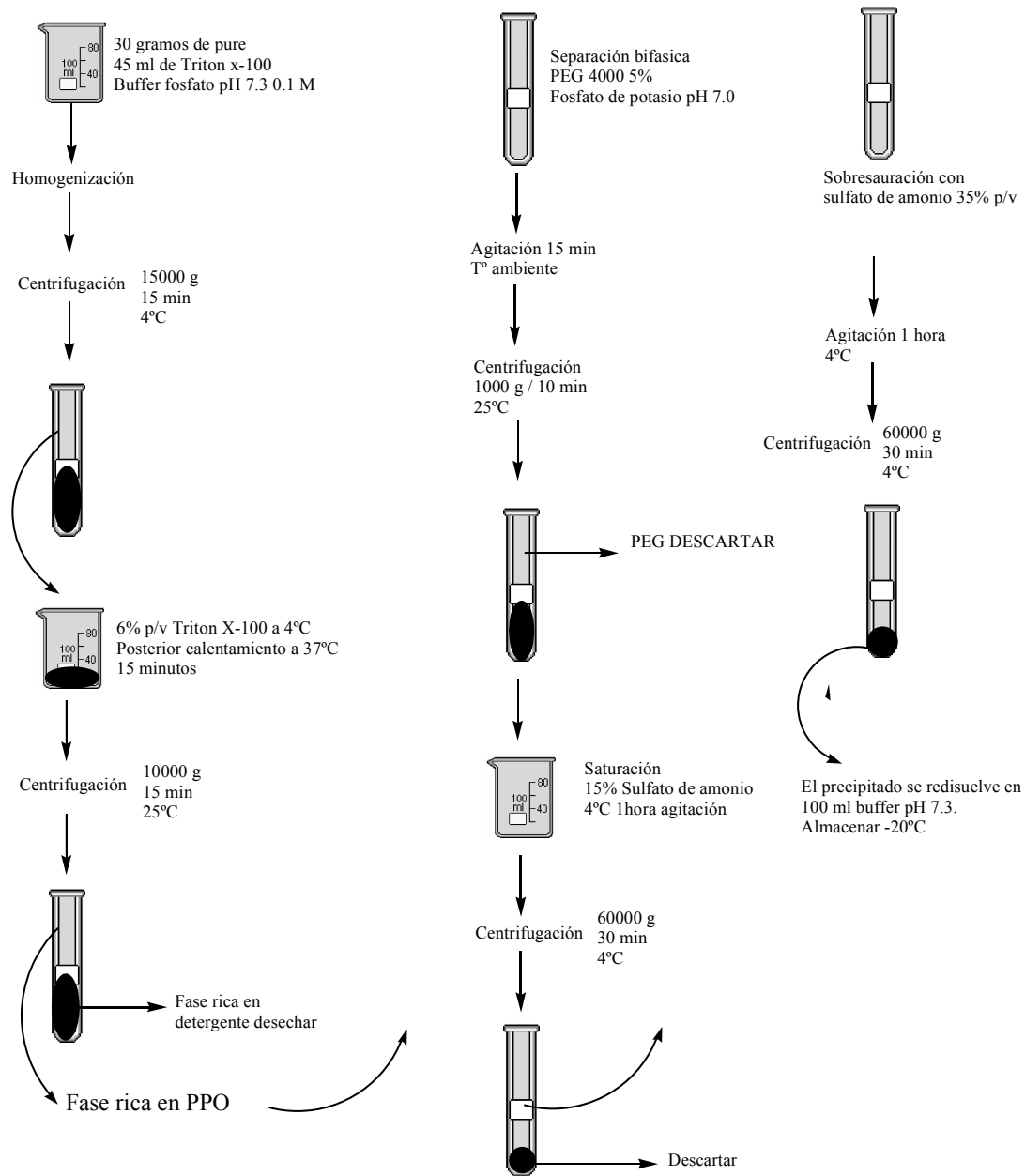


Figura 5. Diagrama de flujo para la extracción y purificación parcial de la PPO por Sistemas Bifásicos Acuicosos *Fuente: Sojo et al.(1998)*

2.2. ISOESPINTANOL COMO ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes naturales en alimentos, pueden provenir de compuestos endógenos de uno o más componentes del alimento, de sustancias formadas de reacciones durante el procesamiento o de aditivos alimenticios aislados de fuentes naturales. La mayoría son compuestos fenólicos presentes en todas las frutas y vegetales ampliamente consumidos en la dieta diaria en forma fresca o como derivados de productos alimenticios (Rojano *et al.* 2007).

Estos compuestos son usados en la industria de alimentos por su capacidad antioxidante; además, retardan el desarrollo del olor rancio, disminuyen la posibilidad de generación de compuestos tóxicos, evitan la decoloración de los pigmentos, no permiten los cambios en la textura, disminuyen la pérdida de valor nutricional causada por la degradación de los ácidos grasos esenciales y por la destrucción de las vitaminas A, E y D (Rosas 2004).

Los antioxidantes fenólicos de plantas comúnmente incluyen componentes como flavonoides, derivados de ácido cinámico y tocoferoles. Muchos compuestos fenólicos son buenos sustratos del pardeamiento y buenos antioxidantes como las catequinas, por el contrario, los flavonoles no son buenos sustratos de pardeamiento pero son antioxidantes muy activos.

Las fuentes naturales de antioxidantes han sido ampliamente estudiadas. Estas plantas incluyen diferentes órganos tales como semillas, frutas, hojas, entre otros. Las plantas con contenido de fenoles y algunos de sus productos de degradación son multifuncionales y pueden actuar como agentes reductores, reaccionantes con radicales libres, quelantes y atrapadores de oxígeno singulete (Gil 2007).

Los estudios más recientes sobre la planta *Oxandra cf. xylopioides* (*Annonaceae*) perteneciente al género de *Magnoliales*, presentan como metabolitos altamente bioactivos, el berenjenol y el isoespintanol. El isoespintanol (2-Isopropil-3,6-dimetoxi-5- metilfenol) es un monofenol extraído del extracto etéreo de las hojas de esta planta, ver figura 6.

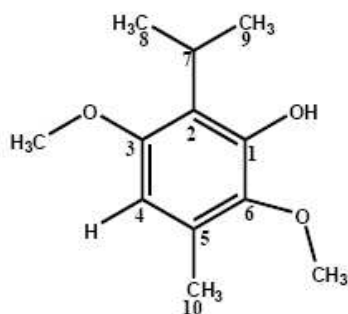


Figura 6. Estructura química del isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol).

Fuente: Rojano *et al* (2007)

El isoespintanol ha sido estudiado para determinar su capacidad antioxidante mediante diferentes técnicas: FRAP, del inglés ferric-reducing antioxidant power. El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul. Una absorción alta a una longitud de onda de 700 nm indica un poder de reducción alto, es decir una actividad antioxidante alta (Martínez 2007).

El método ABTS (6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina) mide la capacidad de captura de radicales libres. El método del DPPH• utiliza el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales.

Comparándolo con el Butil hidroxitolueno (BHT) y timol se concluye que el isoespintanol es mejor reductor que el BHT gracias a la capacidad que tiene para reducir el Fe^{3+} hasta Fe^{2+} en el ensayo FRAP. El BHT es un mejor atrapador de los radicales libres ABTS y DPPH y en sistemas emulsificados como decoloración de β -caroteno y en la peroxidación lipídica en el sistema Fe-

ascorbato la capacidad protectora de ambos compuestos es muy similar. El isoespintanol reacciona lentamente cuando atrapa radicales libres, por lo tanto su efecto protector es tardío permitiendo un posible uso en la conservación de alimentos con alto contenido de grasas o sistemas alimenticios emulsificados (Rojano 2008).

Se ha demostrado mediante estudios teóricos que el isoespintanol presenta una gran capacidad antioxidante comparándolo con su homólogo el Timol (2-isopropyl-5-metilfenol), (Rojano 2007), ver figura 7.

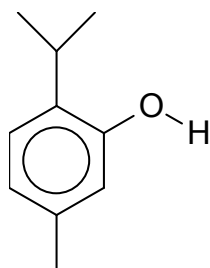


Figura 7. Estructura química del Timol. *Fuente:* Gil (2007)

El ácido ascórbico, figura 8, como antioxidante es uno de los aditivos más utilizados en la industria de los alimentos como conservante y principalmente como inhibidor de pardeamiento. Una de sus grandes desventajas es su inestabilidad a altas temperaturas, la luz y la concentración que incrementan la velocidad de degradación de éste a ácido dehidroascórbico, DHAA (Mazin *et al.* 2006). Por tanto, éste confiere una protección temporal ya que es oxidado a ácido dehidroascórbico (DHAA), en el proceso de pardeamiento, permitiendo que la quinona se acumule y tenga un efecto contrario (Laurila 2002).

Los procesos de pardeamiento suceden de manera lenta a partir de la degradación del ácido ascórbico, pero cuando se forma el DHAA la reacción se acelera. Se han identificado dos compuestos de degradación como son: 3,4-dihidroxi-5-metil-2-5(H)-furanona y el ácido 2-furanocarboxílico (Sawamura *et al.* 2000).

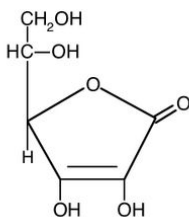


Figura 8. Estructura química del ácido ascórbico. *Fuente:* Bohinski (1991).

El efecto del ácido ascórbico, bisulfito de sodio, y otros reactivos en la reducción de la polifenol oxidasa ha sido polémico en los últimos años. El efecto del sulfito y ácido ascórbico han sido más estudiados debido a su amplio uso en la industria de alimentos. Los primeros informes indican que el ácido ascórbico no tuvo efecto directo sobre la actividad de la PPO. En 1979, Varoquaux y Sarris sugirió que el ácido ascórbico no inhibe ni activa la enzima. Sin embargo, varios investigadores, reportan la inactivación de la enzima por el ácido ascórbico (Pizzocaro 1993). Ultimos estudios demuestran que la acción del ácido ascórbico en la inhibición del pardeamiento es debido a que actúa sobre las quinonas reduciéndolas a *o*-difenoles no coloreados que son compuestos mas estables (Marshall *et al.* 2007; García *et al.* 2005).

Otro tipo de inhibidores de pardeamiento comúnmente usados en frutas mínimamente procesadas son: ácido cítrico, ácido málico y como agentes quelantes el EDTA, los cuales son usados en combinaciones para obtener un mayor efecto de inhibición.

Los tratamientos para inhibir el pardeamiento enzimático utilizan el ácido ascórbico o sus isómeros como el ácido eritorbico, (*d*-ácido isoascórbico), ácido cítrico, EDTA, cisteína, y sus derivados. Recientes trabajos presentan al 4-hexilresorcionol como un buen agente inhibidor de pardeamiento en frutas; sin embargo solo ha sido aprobado para prevenir la decoloración en camarones (Guerrero *et al.* 2004; Mc-Evily *et al.* 1991).

Inmersión en soluciones calientes de ácido ascórbico/ácido cítrico les permite aumentar el tiempo de vida útil a papas pre-peladas por un lapso de 2 semanas. Sin embargo, altas concentraciones de ácido ascórbico (0.75%) le confiere un sabor desagradable a las frutas (Laurila 2002). El 4-isopropilsalicilaldehído ha sido investigado como un potente inhibidor de la tirosinasa inhibiendo ambas actividades, catecolasa y cresolasa, en champiñones (Song 2005).

2.2 SISTEMAS BIFASICOS ACUOSOS (SEBAS) COMO SISTEMAS DE EXTRACCION Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

Una mezcla de dos polímeros, o de un polímero y una sal, en un medio acuoso hace que se presenten dos fases bien diferenciadas, este fenómeno es útil para la separación de material biológico. Esta técnica se inicio en los años cuarentas por P.A. Albertsson, y más tarde resultó ser de gran utilidad en bioquímica de células y en investigaciones biológicas (Kaul 2000).

Los sistemas bifásicos acuosos, SEBAS, es una técnica empleada tanto para extraer enzimas, de una matriz vegetal o animal o como método de purificación parcial. Un sistema bifásico acuoso se forma cuando un polímero como el polietilenglicol (PEG) se mezcla con otro como el dextran, o sales en concentraciones particulares. Por lo tanto, el coeficiente de partición de la proteína en un SEBAS depende no sólo de sus propiedades de superficie tales como la carga o la hidrofobicidad sino también de las propiedades fisicoquímicas de las dos fases formadas, las cuales pueden ser manipuladas ajustando factores como el peso molecular del polímero y las concentraciones de las sales a utilizar, fuerza iónica o pH (Kaul 2000).

Los SEBAS tienen la gran ventaja de producir material biológico concentrado y purificado siguiendo unos simples pasos. Además es una técnica económica en comparación a otros

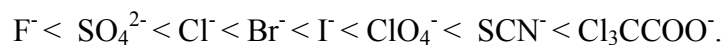
métodos de purificación que incluyen pasos como recuperación, clarificación, filtración, concentración, etc.

Los reactivos utilizados no son tóxicos y los procesos son fáciles de escalar si se trabaja con volúmenes altos de material biológico. Los sistemas bifásicos usualmente usados son: PEG/dextran/agua y PEG/sal/agua para la separación de proteínas. El segundo sistema tiene ventajas sobre el primero por su bajo costo y baja viscosidad (Balasubramaniam 2003).

La mayoría de los polímeros hidrofílicos en solución acuosa son incompatibles o inmiscibles unos con otros, coexistiendo en el equilibrio. La separación de fases en mezclas de polímeros se atribuye al elevado peso molecular de los polímeros en combinación con la interacción entre los segmentos de los polímeros.

El comportamiento del polímero en fase acuosa se ve influenciada por la presencia de sales en función de su naturaleza y concentración. A menudo un sistema polímero-sal-agua que contenga una alta concentración de sal, puede provocar la separación de fases en donde se obtiene una fase inferior rica en sal y pobre en polímero que coexiste con una fase superior rica en polímero y pobre en sal.

La eficacia relativa de diversas sales para lograr la separación de fases sigue la serie de Hofmeister, que clasifica los iones con base en su efecto salino. A bajas concentraciones, los iones interactúan con las proteínas por medio de interacción electrostáticas no específicas, las cuales por lo general ayudan a estabilizar la estructura protéica. El incremento de la concentración de las sales tiene efectos específicos iónicos que influyen la estabilidad estructural de las proteínas, sales como Na_2SO_4 y el NaF la incrementan, mientras que NaSCN y NaClO_4 la debilitan. La estructura protéica se influye más por aniones que por cationes, así, la habilidad relativa de varios aniones (al estar en una fuerza iso-iónica) para influenciar la estabilidad estructural de proteínas sigue la siguiente serie:



Este ordenamiento se conoce como la serie de Hofmeister o serie caotrópica. Las sales de fluoruro, cloruro, y sulfatos son estabilizadores estructurales, mientras que las sales de los otros aniones son desestabilizadoras.

Las sales que estabilizan lo hacen porque incrementan la hidratación de las proteínas y se unen débilmente, mientras que otras desestabilizan al disminuir la hidratación proteica y forman enlaces fuertes. En otras palabras, el efecto desnaturizante que realizan las sales caotrópicas puede estar relacionado con la desestabilización de interacciones hidrofóbicas en proteínas. Las altas concentraciones de compuestos que tienden a romper puentes de hidrógeno, como las sales de úrea y guanidina, también tienden a desnaturizar proteínas. Estas sustancias aparentemente perturban los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura única de las proteínas pero también hay evidencia que sugiere que el clorhidrato de úrea y guanidina podría interrumpir las interacciones hidrofóbicas al promover la solubilidad de los residuos hidrofóbicos en soluciones acuosas.

De aquí se puede derivar el efecto "salting in" y "salting out" de las sales, para solubilizar proteínas y para precipitarlas, respectivamente (Bohinski 1991).

A pesar de ser una técnica fácil de utilizar, su gran desventaja radica en la complejidad de la predicción de la distribución del material biológico en las dos fases y a la comprensión de las fuerzas que gobiernan los efectos de particionamiento (Kaul 2000).

La conformación de un SEBAS para purificar parcialmente un material biológico está constituido generalmente por polietilenglicol/dextran (PEG/dex) y polietilenglicol/fosfato (PEG/fosfato) en solución acuosa. La tabla 4, muestra otras posibles combinaciones de polímero/sal. El diseño de un SEBAS involucra la preparación de soluciones stock de los componentes de las fases, los

cuales son mezclados en proporciones adecuadas. Tanto la concentración del PEG como la del dextran y/o fosfatos se expresan en unidades de porcentaje peso a peso, %p/p. Es común utilizar en este tipo de separaciones algunos aditivos al sistema formado como bactericidas para preservar el material biológico extraído como por ejemplo ázida de sodio 1.0 mmol. Las soluciones stock pueden ser preparados en agua o en buffer. Para un sistema polímero-sal se recomienda utilizar agua para disolver el polímero y buffer del pH deseado para disolver la sal (Forciniti 200).

Tabla 4 Sustancias comunes para la formación de los sistemas bifásicos acuosos. *Fuente:* Kaul (2000)

ESPECIE 1	ESPECIE 2
PEG	Dextran
PEG	Cloruro de sodio
Dextran	Ficoll
Metil Celulosa	Dextran
PEG	Citrato de sodio/Acido cítrico
PEG	NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
PEG	Sulfato de amonio

La selección de un sistema ideal deberá seguir las siguientes reglas:

- Sistema Polímero / Sal. Los más comunes son PEG/K₂HPO₄-KH₂PO₄. Son económicos y favorables con el medio ambiente. Otros sistemas de PEG / ácido cítrico, citrato de sodio también se han utilizado.
- Selección del volumen: Como regla general, cuando utilizan SEBAS por primera vez, debe elegir la igualdad de volúmenes en la parte superior e inferior para facilitar el muestreo y para determinar el coeficiente de partición.
- Buffers: Se utiliza de acuerdo al intervalo de pH deseado. Pueden utilizar soluciones amortiguadoras de fosfato y su concentración debe ser lo más baja entre 20 y 50 mM

- Trabajar a bajas temperaturas para lograr una estabilidad de la enzima

El tiempo para la separación de las fases depende del tipo de especies que forman el sistema, de la densidad, viscosidad y la tensión interfacial entre las fases. Inmediatamente las soluciones del polímero y de la sal se mezclan y agitan el sistema se torna opaco. Al transcurrir aproximadamente 30 minutos se observan las dos fases claramente definidas, ver figura 9. (Forciniti 2000) .

Las moléculas pequeñas generalmente se distribuyen en la capa límite de las dos fases, éste fenómeno se observan mucho más en sistemas PEG/sal por las diferencias físicas de las dos fases, este efecto se puede contrarrestar o minimizar aumentando el peso molecular del polímero para determinar la partición de las moléculas en las dos fases. La partición de las moléculas solubles ocurre en la fase superior ó en la fase inferior. Esta distribución se caracteriza por el término K (Coeficiente de distribución), el cual relaciona la concentración del soluto en la fase superior y en la fase inferior.

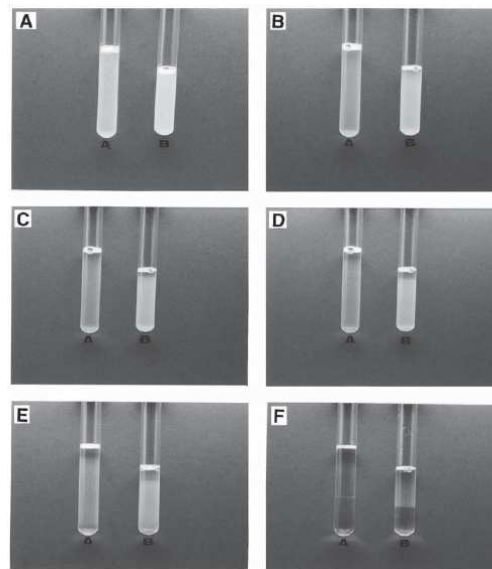


Figura 9 Secuencia fotográfica del fenómeno de formación de fases del sistema PEG/Dx. El sistema utilizado fue PEG 4000 Dx-500 000. *Fuente:* Forciniti (2000).

De acuerdo a la ecuación 1:

$$K = C_t/C_b \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde C_t es la concentración en la fase superior y C_b es la concentración en la fase inferior. En términos de actividades sería la actividad de la enzima en la fase superior y la actividad en la fase inferior. K es función de las propiedades de las fases, las sustancias y temperatura, y es independiente de la concentración del soluto y de la relación de volúmenes de las dos fases.

A partir de un balance de masas en la ecuación 1, durante la partición del material en las dos fases, podemos obtener la relación de la cantidad de soluto en la fase superior y en la fase inferior, G , que esta en función de K , ecuación 2.

$$G = K \times V_t/V_b \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde V_t es el volumen de la fase superior y V_b el volumen de la fase inferior (Teixeira 2000).

La técnica de extracción y posterior purificación de la PPO mediante Sistemas Bifásicos Acuoso no es muy conocida. Se reporta la extracción y purificación de la PPO a partir de papa (*Solanum tuberosum*) en el cual el mejor sistema fue PEG/fosfato a un pH de 7,0 conteniendo un 5% de PEG-8000 y un 28.5% de fosfatos, con un K_a de 32.2, un factor de purificación del 15,7 y un rendimiento de la actividad de la enzima en la fase superior de 97,0%. Es así como los SEBAS pueden ser utilizados como pasos preliminares de purificación en la recuperación de la enzima. Esto puede reducir tiempo y trabajo de procesamiento antes de la aplicación de un paso selectivo de depuración como la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) o la electroforesis.

En el sistema de PEG-fosfato, la PPO se ve muy afectada por el peso molecular del PEG, así como con el pH del sistema (Bhalchandra *et al.* 2006).

Métodos de extracción utilizando SEBAS y Triton X-114 muestran una purificación 5 veces con respecto a extractos crudos de papa (*Solanum tuberosum*) con un 18% de recuperación de la actividad. El Triton X-114 fue utilizado para remover los fenoles y reducirlos a un 3% del contenido inicial en el extracto. Además, esto evita utilizar acetona y otros agentes reductores que pueden disminuir la actividad enzimática. La enzima fue caracterizada cinéticamente con *ter*-butilcatecol y ácido clorogénico como sustratos. Se utilizó como inhibidores de pardeamiento el ácido ascórbico, *m*-bisulfito, L-cisteína y dietilditiocarbamato (Sanchez-Ferrer & García Carmona 1993).

La técnica de extracción y purificación de PPO a través de SEBAS se puede llevar a cabo mediante extracciones sucesivas utilizando el mismo sistema. Sojo, utilizó igualmente Triton X-114 y PEG 8000 / fosfato purificando la enzima 5 veces a partir del extracto crudo obteniendo un 50% de recuperación de la actividad, y una disminución del 6% de taninos. La enzima fue caracterizada cinéticamente con dopamina como sustrato y *ter*-butilcatecol en presencia y ausencia de sodio dodecil sulfato. Además, se determinó KI para ácido Kojico y Tropolona como inhibidores (Sojo *et al.* 1998).

En piña (*Ananas comosus*), una extracción líquido-líquido utilizando SEBAS es útil para la separación y purificación de mezcla de enzimas, bromelina y polifenol oxidasa. En la separación se tienen en cuenta varios parámetros como son el peso molecular del polímero su concentración y la concentración de las sales, además del pH. El sistema formado, PEG1500/fosfato 18% y 14 % p/p. presenta en la fase superior PEG y en la fase inferior la sal de fosfatos. En este caso la polifenol oxidasa es atraída hacia la fase inferior mientras que la bromelina tiende a la fase superior. Se incrementa 4 veces la pureza en el caso de la bromelina. Para la PPO el porcentaje de

recuperación de la enzima es del 90% y su pureza se incrementa 2.7 con respecto al extracto original (Ravindra *et al.* 2008).

Estudios de extracción de amilasa a partir de *Bacillus subtilis* se realizaron mediante SEBAS PEG 1000 (16.7% p/p) con fosfato de potasio (14.8% p/p). a pH 6.0, obteniendo como resultado una recuperación de la actividad de la enzima del 45.2% en la fase rica en fosfato (Bezerra *et al.* 2006).

Sistemas diferentes como PEG/citrato se han utilizado para remover proteasas de *Clostridium perfringense* en medios fermentados. Para cada uno de los estudios, la selección del mejor sistema de separación es el resultado de la variación del peso molecular de polímero, su concentración, la elección del tipo de sal y su concentración. Además, se debe tener en cuenta el pH al cual la enzima presenta su mayor actividad.

Bajo las siguientes condiciones, PEG 10,000 g/mol, al 22 % p/p y Citrato 8.0 % p/p a pH 8.5, el sistema es útil para remover proteasas obteniendo un rendimiento del 95% con un factor de purificación de 4.2.

7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La velocidad a la que ocurre una reacción catalizada por una enzima está determinada por un número de factores tanto inherentes como externos a ella. Se han desarrollado varios métodos matemáticos agrupados bajo el término de cinética para la cuantificación de los factores que afectan la velocidad de reacción (Hencht 1998). La cinética enzimática permite caracterizar una enzima individual y proveer datos acerca del funcionamiento bajo diferentes condiciones fisiológicas, además de brindar información acerca del mecanismo de catálisis (Conn *et al.* 1996). La velocidad a la cual una enzima cataliza una reacción es conocida como “actividad

enzimática”. Esta puede ser medida por la velocidad de formación de productos o desaparición de reactivos en presencia de una cantidad de enzima dada (Engel 1996).

La medida de la actividad enzimática de la PPO esta determinada por su cinética, de esta forma se puede evaluar su disminución o inhibición del pardeamiento enzimático en presencia de los antioxidantes estudiados. Los dos principales métodos para medir la actividad de la PPO son la espectrometría de absorción y los métodos de reflectancia (Ramirez *et al.*2003). Muchos autores utilizan diversos procedimientos y sustratos dependiendo de la actividad estudiada.

El mecanismo detallado de acción es único para cada enzima. Los primeros conocimientos sobre el comportamiento enzimático o la teoría del estado estacionario de la cinética enzimática se deben a V. Henri (1903) y más tarde a L. Michaelis y Maud L. Menten en 1913 (Bohinski 1991).

2.3. COLOR COMO INDICADOR DE LAS REACCIONES DE PARDEAMIENTO

El sabor, la textura, olor y el color son atributos que los consumidores tienen presente para evaluar la calidad de los alimentos al momento de adquirirlos. El cambio en el color en frutas y hortalizas está relacionado con reacciones entre sus componentes como clorofilas, carotenoides, antocianinas, o por reacciones enzimáticas. Las reacciones de pardeamiento enzimático permiten el estudio de la evolución en el tiempo del cambio de color de un tejido vegetal por acción de la Polifenoloxidasa. De aquí, se deriva el cálculo de ciertos parámetros como el Índice de Pardeamiento (IP) o el cambio de color normalizado (ΔE), los cuales son útiles en la investigación del control del pardeamiento en frutas, al evaluar diferentes clases de antioxidantes (Perez 2007).

El espacio de color tridimensional, CIE-L*a*b*, define las magnitudes colorimétricas que se derivan matemáticamente de los valores tri-estímulo y pueden considerarse como una respuesta de los observadores patrones a un estímulo luminoso. Este espacio cartesiano está definido por tres coordenadas L*, a* y b*. L* es el eje vertical y representa la medida de la luminosidad de un color, variando desde cero para un negro hasta 100 para un blanco (los colores fluorescentes pueden dar un valor de L* mayor que 100). a* es uno de los dos ejes horizontales y representa una medida del contenido de rojo o de verde de un color. Si un color tiene rojo, a* será positiva, mientras que si a* es negativa entonces el color tendrá cierta cantidad de verde. b* es el otro eje horizontal, perpendicular al eje a*. Valores positivos de b* indican contenido de amarillo, mientras que valores negativos de b* indican contenido de azul (MacDougall 2002). Ver figura 10.

Los números L*, a*, b* son importantes cuando se busca obtener numéricamente las diferencias de color. El valor numérico de la diferencia de color, ΔE, se determina por medio de la ecuación 3.

$$\Delta E = [\Delta L^2 + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2} \quad \text{Ecuación 3}$$

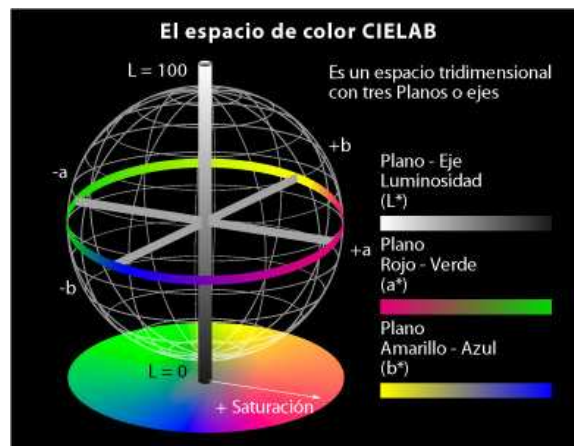


Figura 10. Espacio de color CIE-L*a*b*. *Fuente:* Westland (2008).

ΔE^* es siempre positiva y es estrictamente la medida de la diferencia total de color entre el estándar y la muestra, pero no da información del tipo de diferencia. Sólo si la diferencia de claridad sea positiva o negativa nos dirá si la muestra del ensayo es más clara o más oscura que la referencia. Este realmente expresa la dirección de la diferencia de color (Molto 2007).

El comportamiento de un producto alimenticio durante su almacenamiento puede ser estudiado desde el punto de vista de sus propiedades reológicas como es la textura además de seguir el cambio de color en el tiempo. El comportamiento durante el almacenamiento a 20°C sin atmósfera controlada de dos variedades distintas de bananos *Musa cavendish* y la *Musa paradisiaca*, fueron estudiadas utilizando para el análisis de color un colorímetro Hunter Labscan II; los resultados se expresaron de acuerdo al sistema CIE-L*a*b* con referencia al iluminante D65 y un ángulo visual de 10°. Observándose que durante el almacenamiento a 20°C, la cáscara de banano cambia de color de verde a amarillo, lo que correspondía a los aumentos en los valores de a * b * (Salvador 2007).

Otra de las aplicaciones del sistema CIE-L*a*b* ha sido la evaluación del ácido gálico y sus equivalentes en vinos, teniendo en cuenta las coordenadas L*a*b*, su cromaticidad y el tono (Yildirin 2006).

El efecto de los antioxidantes ácido ascórbico, en un 0,5% y 1%, cisteína en un 0,1%, 0,3% y 0,5% y 4-hexilresorcinol en un 0,005% y 0,02%, se incorporaron en formulaciones de recubrimientos comestibles para manzanas frescas cortadas en rodajas. Se evalúan los parámetros CIE-L*a*b* y su incidencia en el pardeamiento demostrando que el 4-Hexil resorcinol presenta mayor efectividad en el control de pardeamiento (Perez-Gago 2006).

Manzanas mínimamente procesadas fueron Recubiertas con alginatos como posibles mecanismos de conservación, se midió la evolución en el tiempo de las reacciones de pardeamiento, para lo cual, se determinaron los parámetros CIE-L*a*b* y su índice de pardeamiento definido según la ecuación 4 (Olivas 2007).

$$x = (\alpha^* + 1.75L^*) / (5.645L^* + a^* - 3.012b^*) \text{ Ecuación 4}$$

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Medir el efecto inhibitorio del Isoespintanol, el ácido ascórbico y mezclas de ambos, sobre la actividad de la Polifenol oxidasa parcialmente purificada de la pulpa de banano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Purificar parcialmente la polifenol oxidasa extraída del banano (*Cavendish valery*) mediante Sistemas Bifásicos Acuosa y evaluar su actividad utilizando como sustrato dopamina.

Medir la capacidad inhibitoria del isoespintanol, ácido ascórbico y sus sinergias sobre la polifenol oxidasa parcialmente purificada.

Medir el cambio de color normalizado en puré de banano por efecto del isoespintanol, ácido ascórbico y sus sinergias.

CAPITULO I

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIFENOL OXIDASA EXTRAÍDA DEL BANANO (*Cavendish valery*) MEDIANTE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS CON ISOESPINTANOL Y ÁCIDO ASCÓRBICO

Inhibition of Polyphenol Oxidase in Banana (*Cavendish Valery*) extracted using aqueous Two Phase System with Isoespintanol and Ascorbic Acid.

Carlos A. GUERRERO E.^{1*}; Benjamín A. ROJANO.²; Leonidas MILLAN C¹.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo la extracción y la purificación parcial de la polifenol oxidasa de la pulpa de banano (*Cavendish valery*) usando sistema bifásicos acuosos (SEBAS) y la inhibición de su actividad usando isoespintanol y ácido ascórbico. La polifenol oxidasa fue purificada parcialmente usando un sistema PEG/Fosfato. El sistema de extracción se llevo a cabo a pH 7.0 con un 5% de PEG 8000 y 28.5% de fosfatos obteniendo un coeficiente de partición, K_a , de 23, un factor de purificación de 12.99 y un 82,14% de rendimiento de la actividad de la enzima en la fase superior. La enzima fue cinéticamente caracterizada con dopamina como sustrato dando como resultado K_m 0,01534M, $V_{m\acute{a}x}$. 0,1035(M/min) y la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ 6.74 min^{-1} . Además, se determinaron los valores de K_i para el ácido ascórbico y el isoespintanol (0,03992 y 0,03906 respectivamente). Los resultados muestran que el 91.31% de inhibición fue

¹ Facultad de ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Calle 59ª No 63-20, Bloque 14, Medellín Colombia. A.A. 568

² Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 59ª No 63-20, Bloque 15, Medellín Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: cguerrer@unal.edu.co

obtenido por el ioespintanol a 2000ppm. La interacción entre el ioespintanol y el ácido ascórbico tuvo un efecto negativo sobre el pardeamiento enzimático.

Palabras Claves: polifenol oxidasa, sistemas bifásicos acuosos, PEG 8000, coeficiente de partición, factor de purificación

ABSTRACT

The aim of this work is to extraction and partial purification of polyphenol oxidase from the pulp of banana (Cavendish Valery) using aqueous two phase system (ATPS) and the inhibit its activity with ioespintanol and ascorbic acid. Polyphenol Oxidase from banana pulp was partially purified using ATPS based on polyethylene glycol and Phosphate (PEG 8000/Phosphate). The optimum system was at pH 7.0 containing 5% PEG 8000 and 28.5% phosphate, with partition coefficient, K_a , of 23, purification factor of 12.99 and a 82,14% with an enzyme activity output at the upper phase. The enzyme was kinetically characterized with substrate dopamine. K_m 0,01534M, $V_{m\acute{a}x}$ 0,1035(M/min) and $V_{m\acute{a}x}/K_m$ 6.74 min^{-1} . In addition, the effects of ascorbic acid and ioespintanol was also tested, and the K_i values were determined: 0,03992 y 0,03906 respectively. The results showed that 91.31% inhibition was obtained with ioespintanol at 2000 ppm. The interaction of ioespintanol and ascorbic acid was found to have a negative effect on the inhibition of enzymatic browning.

Keywords: polyphenol oxidase, aqueous two phase system, PEG 8000, partitioning coefficient, purification factor.

INTRODUCCION

La demanda de frutas frescas y hortalizas mínimamente procesadas ha aumentado de forma considerable durante la última década, especialmente en los países desarrollados, como consecuencia de un estilo de vida saludable a raíz de la evidencia epidemiológica que correlaciona la ingesta regular de frutas y hortalizas frescas con un menor riesgo de desarrollar varias enfermedades crónicas y degenerativas (1-3).

La vida útil de un producto mínimamente procesado desde el punto de vista nutricional, microbiológico y sensorial ha de ser de al menos 4-7 días, pero preferentemente hasta 21 días dependiendo de las condiciones de almacenamiento y de la región (4); estos se deterioran a causa del envejecimiento fisiológico, cambios bioquímicos, reacciones de pardeamiento, descomposición microbiana; que pueden dar lugar a la degradación del color, la textura y el sabor (5-7).

La Polifenol Oxidasa (PPO) es una enzima que contiene cobre en su sitio activo y es la responsable del pardeamiento enzimático en frutas y vegetales catalizando dos diferentes reacciones en presencia de oxígeno: La hidroxilación de una monofenol a *o*-difenoil (actividad monofenolasa EC 1.14.18.1) y la oxidación de una *o*-difenoil a *o*-quinona (actividad difenolasa EC 1.10.3.1) (8-11).

Varios métodos se han utilizado para evaluar la inhibición de la actividad de la PPO en frutas y vegetales; los sulfitos se han usado como agentes para prevenir el pardeamiento, y han sido asociados con alergias severas en ciertas poblaciones vulnerables, dando como resultado el uso restringido a ciertas aplicaciones (12,13). Los tratamientos térmicos no son apropiados para inhibir este tipo de reacciones; mientras que, la adición de ácido ascórbico ha sido una buena alternativa al uso de sulfitos o la utilización de otros agentes químicos (14,15), la exclusión de

oxígeno, refrigeración y varios tratamientos no térmicos (16-19) y tratamientos emergentes (20-22) han mostrado buenos resultados.

En banano, los estudios sobre PPO inician con evidencias que indican que las reacciones de pardeamiento resultan de la oxidación de la dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) por la enzima polifenol oxidasa (23). Palmer caracteriza cinéticamente la enzima y determina su actividad con varios sustratos siendo el mejor la dopamina a pH 7.0 (24). Estudios posteriores utilizan como sustrato dopamina y *ter*-butilcatecol y se determina K_i con tropolona y ácido kojico como inhibidores (25). Estudios en banano (*Musa sapientum* L.) utilizan dopamina como sustrato. La enzima purificada se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y sodio dodecil sulfato (SDS)-PAGE. Se estima su peso molecular entre 41000 y 42000 Kda y su K_m de 2.8 mM. Su pH óptimo de actividad fue 6.5. a 30°C. La actividad de la enzima fue completamente inhibida con ácido ascórbico, cisteína, dietilditiocarbamato de sodio y cianuro de potasio (26). Para el banano (*Musa acuminata*), la extracción de la PPO se realizó con un buffer fosfato pH 7.0, polivinilpirrolidona y triton X-100. Los valores de K_m se obtuvieron con dopamina y D-catequina y su inhibición se realizó con metabisulfito de sodio y ditiotreitól (27). Igualmente, se emplea buffer fosfato, polivinilpirrolidona y Triton X-100 para extraer, aislar y purificar la PPO del banano variedad Dwarf (*Musa cavendishii*, L.). La enzima se purifica 38.8 veces a partir del extracto crudo precipitándola con acetona y realizando varias re-extracciones. La enzima se hace pasar a través de una columna cromatográfica que contiene Sephadex como fase estacionaria y el mismo buffer como eluyente. Se determina su peso molecular por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida que oscila entre 31000 y 62000 para 2 isoenzimas. La enzima fue estable a 55°C por 30 min (28).

Su mayor actividad se da a un pH de 7.0 a 30°C; K_m y V_{max} fueron 8.5 mM y 0.754 OD a 410 min^{-1} respectivamente. Los inhibidores utilizados fueron ácido ascórbico y metabisulfito de sodio

(29). De manera similar se han adelantado estudios de extracción, purificación, caracterización e inhibición de la PPO en diferentes frutas y hortalizas dependiendo del interés de los investigadores en determinada especie; por ejemplo en café, en jugo de manzana, papas, tabaco, menta, lechuga, entre otras. (7, 30-44).

Es así como el presente estudio tiene como objetivo purificar parcialmente la polifenol oxidasa a partir de la pulpa de banano utilizando sistemas bifásicos acuosos y estudiar la inhibición con Isoespintanol y ácido ascórbico y su sinergia utilizando dopamina como sustrato. Además se evaluará el cambio de color normalizado (ΔE^*) en pulpa de banano con ayuda del análisis de las coordenadas CIE $L^* a^* b^*$.

Los fenoles contenidos en ciertas plantas y algunos de sus productos de degradación son multifuncionales y pueden actuar como agentes reductores, atrapadores de radicales libres, quelantes y desactivadores de oxígeno singulete (45). Los estudios más recientes sobre la planta *Oxandra cf. xylopioides* (*Annonaceae*) perteneciente al género de *Magnoliales*, presentan como metabolitos altamente bioactivos, el berenjenol y el isoespintanol. El isoespintanol (2-Isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es un monofenol extraído del extracto etéreo de sus hojas. El isoespintanol ha sido estudiado para determinar su capacidad antioxidante mediante diferentes técnicas: FRAP, ABTS y DPPH comparándolo con el BHT; se encontró que el isoespintanol es mejor reductor que el BHT gracias a la capacidad que tiene para reducir el Fe^{3+} hasta Fe^{2+} en el ensayo FRAP. El isoespintanol reacciona lentamente cuando atrapa radicales libres, por lo tanto su efecto protector es tardío permitiendo un posible uso en la conservación de alimentos con alto contenido de grasas o sistemas alimenticios emulsificados. Por estos antecedentes, en este trabajo se estudia el efecto inhibitorio del Isoespintanol, del ácido ascórbico y sus mezclas, sobre la actividad de la Polifenol Oxidasa parcialmente purificada del banano(46). Además se evaluará la

evolución del pardeamiento en función del cambio de color normalizado (ΔE^*), analizando las coordenadas CIE L* a* b*.

Se ha demostrado mediante estudios teóricos que el isoespintanol presenta una gran capacidad antioxidante comparándolo con su homólogo el Tymol (2-isopropyl-5-methylphenol) (47).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima.

El estudio se realizó con frutos de banano *Cavendish valery* los cuales fueron obtenidos de la Central Mayorista de Antioquia de la ciudad de Medellín provenientes de la zona de Urabá. La selección de los bananos se basa en la forma, tamaño y grado de madurez No 5 (48). Se almacenan a 5°C en un refrigerador comercial, no importando que su uso sea inmediato.

Caracterización Físicoquímica

El contenido de sólidos solubles (°Brix) fue determinado de acuerdo al método AOAC (1990) 932.12 con un refractómetro Leicca auto ABBE (escala de 0-32%) a temperatura ambiente. La acidez titulable se determinó volumétricamente con NaOH 0.1N mediante el método AOAC (1990) 22.070 (49). El valor del pH fue medido con un potenciómetro Schott de acuerdo con el método AOAC (1990) 981.12. La longitud de la fruta se determina midiendo la curvatura exterior del dedo individual con una cinta desde el extremo distal hasta el extremo proximal, donde se considera que termina la pulpa, la circunferencia del dedo se determina midiendo la fruta individual con una cinta en su punto más ancho (48).

Reactivos

Se utilizó Polietilenglicol de peso molecular 8000 AMRESCO grado reactivo, fosfato diácido de potasio tri hidrato ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), fosfato de sodio monohidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), ácido ascórbico, sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$; CARLO ERBA grado reactivo. Dopamina (clorhidrato de 3 hidroxitiramina) marca SIGMA, albúmina fracción V de suero de bovino marca Merck.

Preparación del extracto crudo

Se utilizó el método empleado por Vaidya modificado (50). La polifenol oxidasa fue extraída homogenizando 20 g de pulpa de banano con 80 ml de buffer fosfato 10 mM pH 7.0. Se utilizó un homogenizador ultra-Turrax Janke & Kundel IKA a 4°C. El homogenato fue filtrado, una porción fue tratada con $(NH_4)_2SO_4$ 20 %p/p y centrifugado a 10.000 x g (Heraeus Biofuge Stratus) por 20 minutos. El precipitado fue re-disuelto en buffer fosfato 50 mM pH 7.0; y el extracto fue utilizado para la purificación parcial mediante sistemas bifásicos acuosos.

Determinación de proteína

El contenido de proteína del extracto en cada paso de la purificación fue determinada por el método de Bradford (1976), que cuantifica la unión del colorante Azul de Coomassie a una proteína desconocida y se compara con una curva estándar de diferentes concentraciones de la proteína de albúmina de suero de bovino (BSA) (51).

Ensayo de la Actividad Enzimática

La actividad enzimática de la PPO fue determinada por métodos espectrofotométricos (26). Se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis Genesys 10. La mezcla de reacción consiste de 1ml de buffer fosfato pH 7.0 10 mM; 0,25 ml de la solución enzimática, y 0.25 ml de dopamina 0,03 mM como sustrato (23). Después de incubar a 30°C por 2 minutos se mide la absorbancia de la mezcla a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como $U = 0.001 \Delta Abs_{420} \text{ min}^{-1} (\text{ml de extracto})^{-1}$ (52).

Preparación del Sistema Bifásico Acuoso

La relación PEG/Fosfato fue: 5 % p/p y 28.5 % p/p; agua 56.5 %p/p; enzima 10 %p/p. Los sistemas fueron preparados por duplicado en tubos de ensayo (50). A las muestras se les permite alcanzar el equilibrio por 30 minutos al cabo de los cuales se centrifugan a 6000 x g por 10 minutos. El sistema se mantiene a pH 7.0 a 4°C. Se extrae la fase superior del sistema bifásico que es en donde se encuentra la mayor actividad enzimática.

Inhibición de la Actividad enzimática

Se utiliza ácido ascórbico e Isoespintanol a 250, 505, 1125, 1380, 2000 ppm como inhibidores, actuando de forma separada sobre la enzima. La mezcla de reacción para la inhibición consiste de 1.0 ml de solución amortiguadora pH 7.0; 0,25 ml de enzima; 0,5 ml de dopamina 0,03 M y 0,25 ml de antioxidante.

Medida del color

El color se determinó utilizando el espectrocolorímetro X-RITE, modelo SP60, el iluminante D65 y el observador de 10° como referencia; las medidas se realizaron con componente especular incluida. A partir de los espectros de reflexión se obtuvieron las coordenadas de color del CIE-L*a*b. L* es un indicador de la luminosidad, a* (cromaticidad verde (-) a rojo (+)) y b* (cromaticidad azul (-) a amarillo (+)). El color se midió sobre 10 gramos de pulpa al ser tratada con los antioxidantes a diferentes concentraciones cada hora por un lapso de 24 horas. La diferencia de color normalizada se calcula según la ecuación 1, (53).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

Análisis Estadístico.

Modelo 1. Para el estudio de la inhibición de la actividad antioxidante del ácido ascórbico y del isoespintanol sobre la PPO, se empleó un análisis de varianza de dos vías (tiempo y tratamientos), y las diferencias significativas se compararon por medio de la técnica de rangos múltiples de Duncan, se empleó un nivel de confianza del 95 %.

Modelo 2. Para trabajar las mezclas se generó un diseño central compuesto con las variables: ISO (isoespintanol) y AA (ácido ascórbico), cuyos niveles se muestran en la Tabla 1. Se estudio este diseño, porque permite optimizar los factores, maximizando la cantidad de información que puede ser obtenida con un menor número de experimentos individuales, además no requiere repeticiones (54,55). Se empleo el programa estadístico SAS versión 8.0 para analizar los dos modelos anteriores.

Tabla 1. Variables Independientes codificadas y naturales usadas para la generación del diseño experimental central compuesto.

Variables independientes	Variable Codificada					Variable Natural				
	Niveles					Niveles				
ISO	$-\alpha$	-1	0	+1	α	250	505.8	1125	1380.8	2000
AA	$-\alpha$	-1	0	+1	α	250	505.8	1125	1380.8	2000

El número de experimentos para cada experimento es $2^2 + 4$ repeticiones al centro + 4 puntos axiales para un total de 12 corridas, véase Tabla 2.

Tabla 2. Combinaciones posibles de isoespintanol (ISO) y ácido ascórbico (A.A.) para el diseño experimental central compuesto.

Ensayos	Variable Natural		Variable Codificada	
	A.A.	ISO	A.A.	ISO
1	505,8	505,8	-1	-1
2	1380,8	505,8	+1	-1
3	505,8	1380,8	-1	+1
4	1380,8	1380,8	+1	+1
5	1125	1125	0	0
6	1125	1125	0	0
7	250	1125	- α	0
8	2000	1125	A	0
9	1125	250	0	- α
10	1125	2000	0	α
11	1125	1125	0	0
12	1125	1125	0	0

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización fisicoquímica

La tabla 3 muestra las condiciones bajo las cuales se escogieron las muestras de bananos empleadas para la extracción de la PPO. Los valores son el promedio de tres replicas.

Tabla 3. Características fisicoquímicas del banano variedad *Cavendish valery*.

PARÁMETRO	VALOR
Acidez Total (%)	$1.7 \pm 0,2$
°Brix	$10.8 \pm 0,3$
pH	$4.9 \pm 0,1$
Longitud de la fruta (cm)	$22.3 \pm 0,3$
Circunferencia de la fruta (cm)	$12 \pm 0,3$
Actividad de agua	$0.976 \pm 0,1$

Distribución de la enzima en el Sistema Bifásico Acuoso.

La distribución de la enzima entre las fases fue determinada removiendo cantidades apropiadas de cada fase y midiendo su actividad enzimática. El coeficiente de distribución, K_a , para la enzima fue determinada mediante la ecuación 2.

$$Ka = \frac{As}{Ai} \quad (2)$$

Donde A_s y A_i es la medida de la actividad enzimática en unidades por mililitro en la fase superior y la fase inferior respectivamente. Similarmente el coeficiente de distribución para la proteína, Kp , se determina según la ecuación 3.

$$Kp = \frac{Ps}{Pi} \quad (3)$$

Donde P_s y P_i es la concentración de la proteína en la fase superior e inferior del sistema. Se ha comprobado que la relación PEG 5% y Fosfatos 28,5% permite obtener la mayor actividad de la enzima en la fase superior (50).

Se define el factor de purificación, PF , para la fase superior mediante la ecuación 4.

$$PF = \frac{As/Cs}{Ai/Ci} \quad (4)$$

Donde A_s y A_i es la medida de la actividad enzimática en unidades por mililitro en la fase superior y en la fase inferior en el extracto inicial (antes de someter el extracto a la distribución en el sistema bifásico) respectivamente y C_s y C_i es la concentración de proteína en mg/ml de la fase superior y en la fase inferior en el extracto inicial (antes de someter el extracto a la distribución en el sistema bifásico) respectivamente (50).

El porcentaje de rendimiento de la actividad de la fase superior, Rfs , se define mediante la ecuación 5.

$$Rfs = \frac{100}{1 + \frac{1}{RvKa}} \quad (5)$$

Donde:

$$Rv = \frac{Vfs}{Vfi} \quad (6)$$

Vfs y Vfi son los volúmenes de la fase superior y la fase inferior respectivamente (50).

La Tabla 4 muestra la constante de distribución de la enzima, Ka, de la proteína, Kp, el factor de purificación y el rendimiento obtenido al someter el extracto enzimático a la separación en el sistema bifásico.

Tabla 4. Efecto del sistema PEG/fosfatos sobre la distribución de la enzima en el sistema.

Peso molecular del PEG	PEG (% p/p)	Fosfato (% p/p)	Ka	Kp	PF	% Rfs
8000	5	28.5	23	0,4	12.99	82.14

La relación PEG-fosfato empleada en la purificación parcial de la PPO muestra una buena distribución de la enzima en las dos fases como lo indica el factor de purificación y Ka con respecto a Kp. Esto demuestra que la mayor actividad se obtiene en la fase superior y muy poca en la fase inferior, además se purificó la enzima aproximadamente 13 veces con respecto al extracto crudo, con un rendimiento del 82.14%. La partición de la enzima en las dos fases es un fenómeno complejo guiado principalmente por la interacción entre la proteína y los componentes de la fase, por ejemplo a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre otras.

Extracción y purificación parcial de la PPO

Los resultados de la purificación parcial de la PPO se resumen en la tabla 5.

A partir del extracto crudo la enzima fue purificada 12.99 veces con una actividad específica de 111,52 U/mg en comparación de 1,86 U/mg en la fase inferior. Cabe destacar que el rendimiento de 9.1% de la fase superior se calcula a partir de las unidades totales.

Tabla 5. Purificación parcial de la PPO.

Pasos de la purificación	Vol.(ml)	*Actividad U	Unidades Totales	Proteína (mg/ml)	Actividad Específica (U/mg)	Purificación (Veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	20	252 ± 2.5	5040	29,36 ± 2.1	8,58	1	100
Precipitado	9	216 ± 3.0	1944	6,129 ± 2.2	35,24	4,1	38,6
Fase superior	5	92 ± 5.1	460	0,825 ± 2.0	111,52	12,99	9,1
Fase Inferior	25	4 ± 3.9	100	2,15 ± 2.5	1,86	0,2	2,0

*Promedio de 5 replicas

Una disminución de la actividad de la polifenol oxidasa se observa constantemente en todas las etapas del procedimiento de purificación, como consecuencia de la existencia de diferentes isoformas de la enzima (56). Si bien el volumen de la fase superior es de solamente 5 ml, es suficiente para realizar los ensayos posteriores. Al modificar la relación PEG-Fosfato es posible obtener un mayor volumen en la fase superior pero la actividad decrece. No siempre el obtener un mayor volumen significa una mayor actividad. El efecto del peso molecular del PEG sobre K_a , K_p y el número de veces que es purificada la enzima tiene una relación directa con el peso molecular de la enzima. La naturaleza hidrofóbica del PEG se incrementa con el incremento de su peso molecular, la PPO exhibe una partición selectiva en la fase superior con un peso molecular alto (52). La concentración de fosfatos es la responsable de modificar las propiedades de superficie de la enzima haciéndola mas hidrófoba y como consecuencia ella se distribuirá mas en la fase superior. Sin embargo, un mayor aumento en la concentración de fosfatos hace que la proteína reduzca su solubilidad y por el contrario precipite en la fase inferior (50).

Parámetros Cinéticos de la PPO extraída de la pulpa de bano

El gráfico Lineweaver-Burk, figura 1, permite obtener los parámetros cinéticos para la reacción entre la dopamina como sustrato, a una concentración de 0,03M y un pH de 7.0, y la enzima parcialmente purificada la cual sigue un modelo cinético postulado por Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos obtenidos del gráfico del doble recíproco son: K_m 0,01534M, velocidad máxima 0,1035(M/min) y la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ 6.74 min^{-1} . La afinidad de la PPO por la dopamina es alta (bajo K_m). La relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ indica la eficiencia de la conversión del sustrato por la enzima (especificidad del sustrato).

Efecto de los inhibidores actuando individualmente

La figura 1 muestra la intersección de las tres líneas en un punto del eje vertical ($1/V_0$) lo que indica que el isoespintanol actúa como inhibidor competitivo. El ácido ascórbico es un reductor.

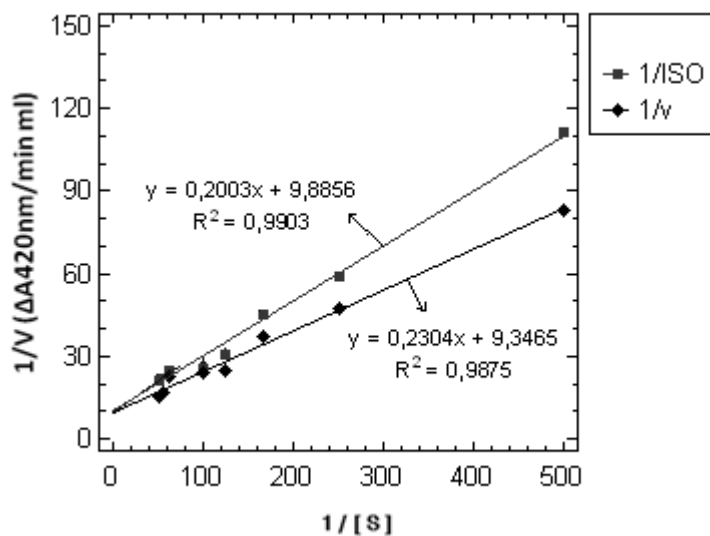


Figura 1. Gráfico del Doble recíproco ($1/V$ versus $1/[S]$) para la enzima PPO \diamond en presencia de isoespintanol \square

Los dos compuestos exhiben inhibición sobre la PPO presentando valores de K_i bajos.

La tabla 6 muestra el efecto de los inhibidores sobre la acción de la PPO además del control que es la enzima parcialmente purificada. Comparando el porcentaje de inhibición con el control (100% actividad) observamos que los dos presentan inhibición de la actividad a partir de 250 ppm de manera considerable siendo el efecto del ácido ascórbico del 43,48% contra el 35,65% del isoespintanol. A 2000 ppm la acción del ácido ascórbico no hace posible detectar actividad de la PPO asumiendo que ésta ha sido inhibida por completo. El isoespintanol muestra gran actividad antioxidante al inhibir la actividad de la PPO llegando a un 91.31% de inhibición a 2000 ppm. Valores promedio de 5 replicas.

Tabla No 6. Inhibición de la actividad enzimática de la PPO con Isoespintanol y ácido ascórbico.

Compuesto	Concentración (ppm)	*Actividad Enzimática Fase Superior (U)	Coefficiente de variación	Porcentaje de inhibición
Control	-	92	-	-
Isoespintanol	250	59,2 ± 2,77	4,69%	35,65 ± 3,02
	505	23,8 ± 1,30	5,48%	74,13 ± 1,42
	1125	20 ± 2,12	10,61%	78,26 ± 2,30
	1380	16 ± 2,55	15,93%	82,61 ± 2,77
	2000	8 ± 2,92	36,44%	91,31 ± 3,17
Ácido Ascórbico	250	52 ± 5,00	9,62%	43,48 ± 5,43
	505	16 ± 5,70	35,63%	82,61 ± 6,20
	1125	12 ± 4,53	37,73%	86,96 ± 4,92
	1380	4 ± 2,00	50,00%	95,65 ± 2,18
	2000	n.d	n.d	n.d

n.d. No detectada

La figura 2 muestra que la acción de los inhibidores es más drástica a 250 ppm disminuyendo la actividad en 32.8 y 40 unidades para el isoespintanol y el ácido ascórbico respectivamente. Si comparamos la acción de los dos antioxidantes sobre la actividad enzimática observamos que

entre ellos existen diferencias significativas, véase tabla 8. La inhibición obtenida a una concentración de 1380 ppm con isoespintanol la puedo lograr con 505 ppm de ácido ascórbico.

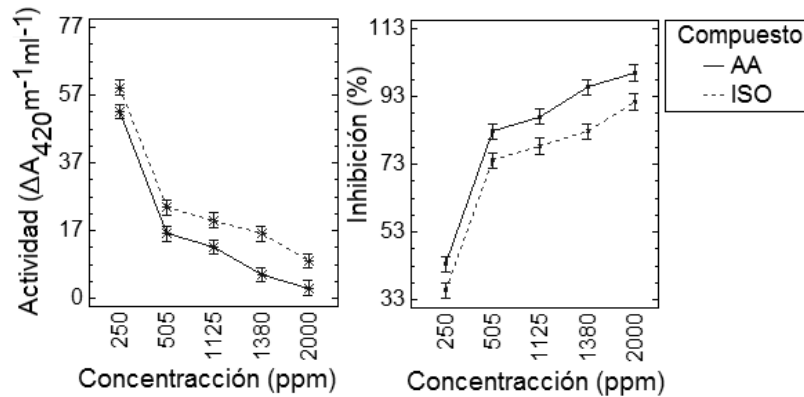


Figura 2. Efecto de la concentración de los inhibidores sobre la actividad de la PPO y el porcentaje de inhibición.

La tabla 7 muestra los valores medios de la actividad y el porcentaje de inhibición mostrando diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Tabla 7. Valores medios de la actividad y porcentaje de inhibición de la PPO.

Compuesto	Actividad (U)	Inhibición (%)
AA	16,80 ± 0,67 a	81,74 ± 0,72 a
ISO	25,40 ± 0,67 b	72,39 ± 0,72 b

Letras diferentes por fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba rangos múltiples de Duncan

Se observa como el ácido ascórbico presenta menor valor de actividad y mayor porcentaje de inhibición. Existen diferencias significativas respecto al compuesto y los tratamientos ($p < 0.05$).

La tabla 8 muestra el efecto de los dos inhibidores actuando individualmente sobre el cambio de color normalizado, ΔE^* , en la pulpa de banano.

Tabla 8. Valores medios de isoespintanol y ácido ascórbico respecto al ΔE^* .

Isoespintanol		Ácido Ascórbico	
Tratamiento	Valor medio ΔE^*	Tratamiento	Valor medio ΔE^*
505,8	22,46 a	1380	16,93 a
1125	24,00 b	505,8	21,84 b
250	25,48 c	1125	26,45 c
1380	26,65 d	2000	26,49 c
2000	36,67 e	250	39,51 d
control	40,12 f	control	43,32 d

Letras diferentes por fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba rangos múltiples de Duncan

Tomando como variables respuestas el isoespintanol y el ácido ascórbico, se observaron diferencias significativas respecto al tiempo y los tratamientos ($p < 0.05$). El tratamiento a 505,8 ppm con isoespintanol presenta el menor valor de ΔE^* , comparado con el ácido ascórbico que logra a 1380 ppm.

La figura 3 muestra los tratamientos anteriores que presentaron diferencias significativas, isoespintanol a 505,8 ppm y ácido ascórbico a 1380 ppm, en el tiempo.

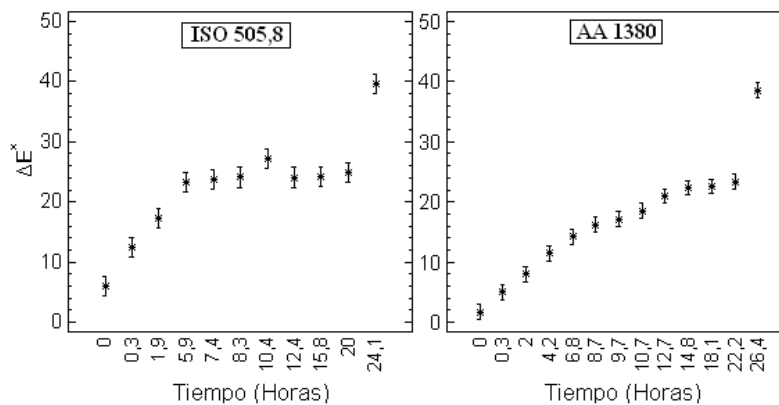


Figura 3. Variación de ΔE^* en el tiempo a 505,8 ppm de isoespintanol y 1380 ppm de ácido ascórbico.

El comportamiento del isoespintanol, si bien controla el cambio de color normalizado, no lo hace de una manera efectiva. A las 0,3 horas su ΔE^* es aproximadamente 12 en comparación a 5 con

el ácido ascórbico al mismo tiempo. Cabe anotar que los dos inhibidores van perdiendo su capacidad antioxidante en el tiempo debido a la formación de sustancias pro-oxidantes que ayudan a formar pigmentos oscuros.

Análisis Estadístico de la Mezcla Ácido ascórbico-Isoespintanol

En la tabla 9 se muestra el análisis de varianza de la variable respuesta ΔE^* y la actividad enzimática. El error cuadrático estadístico indica que el modelo ajustado explica en un 79.58% la variabilidad de ΔE^* y un 90.68% de la variabilidad en la actividad. El error cuadrático ajustado, que es más recomendable para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 62.57% para el ΔE^* y 82.92% para la actividad.

Tabla 9. Análisis de Varianza de la inhibición de la PPO

Variable	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Valor F	Valor P
(ΔE^*)	A: AA	17,5525	1	17,5525	10,57	0,0429
	B: ISO	0,216829	1	0,216829	0,13	0,7418
	AB	5,61732	1	5,61732	3,38	0,1632
	Carencia de Ajuste	40,23	3	13,41	8,08	0,0600
	Error Puro	4,9818	3	1,6606		
	Total	221,49	11			
		$R^2 = 79.58\%$	R^2 ajustado = 62.57%			
Actividad	A: AA	63395,3	1	63395,3	115,26	0,0017
	B: ISO	4,87552	1	4,87552	0,01	0,9309
	AB	2351,11	1	2351,11	4,27	0,1305
	Carencia de Ajuste	6246,62	3	2082,21	3,79	0,1516
	Error Puro	1650	3	550		
	Total	84806,9	11			
		$R^2 = 90.68\%$	R^2 ajustado = 82.92%			

La sinergia ácido ascórbico-isoespintanol indica que su efecto es no significativo al inhibir la PPO tanto al analizar su actividad como su ΔE^* . Este comportamiento se debe a que el isoespintanol es menos reductor que el ácido ascórbico, datos estudiados por Rojano (47) donde

se demostró que la actividad reductora del isoespintanol es 65.9g/100g de muestra. Esto quiere decir que para obtener el efecto antioxidante de 65.9 g de ácido ascórbico necesito 100 g de isoespintanol. De tal manera que el proceso de inhibición de las actividades individuales puede deberse a una reacción redox entre los dos compuestos donde el ácido ascórbico cede un electrón al isoespintanol formando el ácido dehidroascórbico y el anión isoespintanol; donde el electrón se deslocaliza por toda la molécula, inhibiendo el efecto antioxidante; de igual manera le ocurre al ácido ascórbico de acuerdo a la siguiente reacción, ver figura 4.

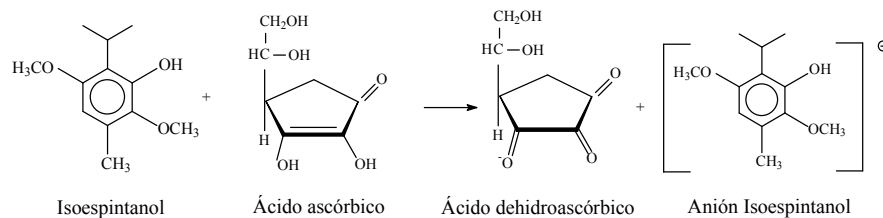


Figura 4. Reacción postulada para explicar la anulación de la sinergia entre el isoespintanol y el ácido ascórbico.

El efecto de los dos factores sobre la actividad y ΔE^* lo podemos mirar en la figura 5. Se toman como concentraciones de análisis 505.8 y 1380.8 ppm. Al mantener constante la concentración de isoespintanol, 505.8ppm, y variar la concentración de ácido ascórbico entre 505.8 y 1380.8 ppm se crea un punto de inflexión obteniéndose un mínimo ΔE^* . Ahora, al mantener constante la concentración de isoespintanol a 1380.8 ppm y variar la concentración de ácido ascórbico entre 505.8 y 1380.8 ppm se obtienen un mínimo ΔE^* que esta en el valor medio entre ellos. Por lo tanto, Trabajar a concentraciones altas de los dos inhibidores no presenta una reducción notable de ΔE^* .

Para la actividad enzimática, el ácido ascórbico afecta la actividad enzimática a cualquier nivel de isoespintanol, Véase Figura 5.

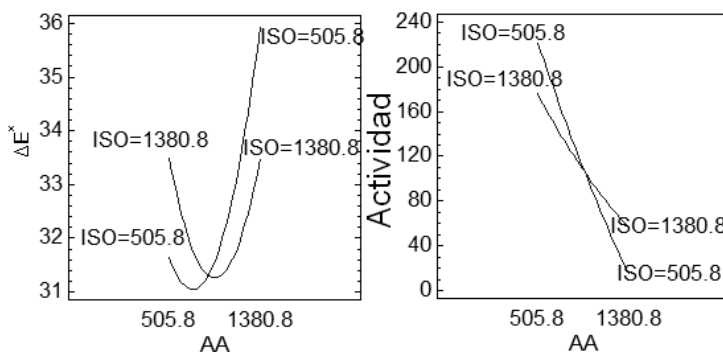


Figura 5. Efectos de los factores (Ácido ascórbico e Isoespintanol) en ΔE^* y Actividad enzimática.

Con la metodología de la pendiente ascendente se obtuvieron los valores de los factores que optimizan la variable respuesta (ΔE^*) y la actividad enzimática. El mínimo de ΔE^* se obtiene cuando se combina 833.08 ppm de ácido ascórbico con 923.466 ppm de isoespintanol, y el valor que se obtiene es 29.94 ΔE^* . Respecto a la actividad se observa como el mínimo se obtiene cuando se combina 1988.12 ppm de ácido ascórbico con 1180.05 ppm de isoespintanol, y el valor que se obtiene es 0 actividad. La superficie de repuestas para la variable dependiente estudiada, se presenta en la Figura 6.

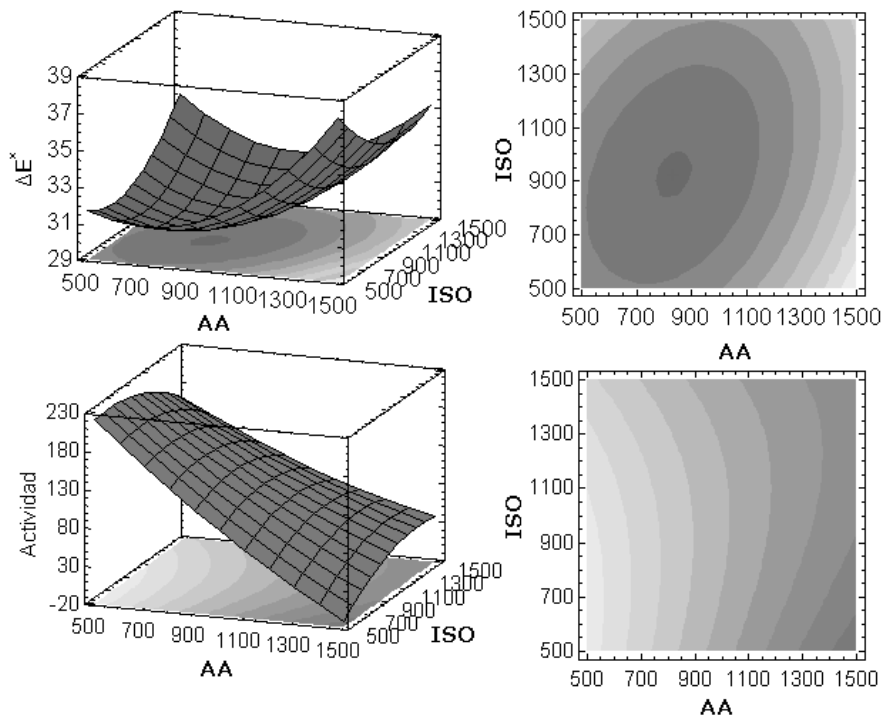


Figura 6. Superficies de respuesta que relaciona ISO y AA con ΔE^* y actividad enzimática.

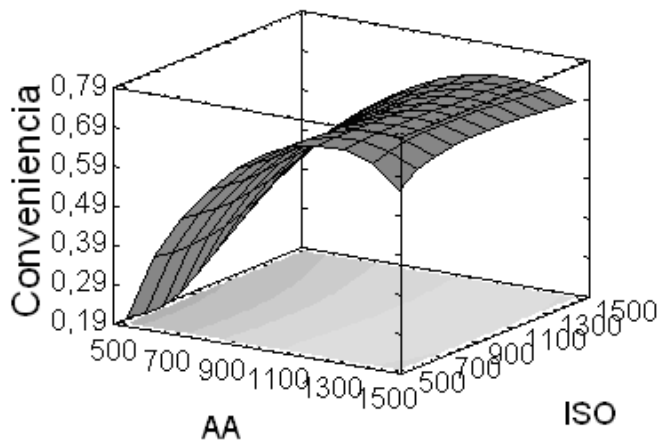


Figura 7. Superficie de respuesta para la conveniencia entre ΔE^* y actividad enzimática.

La combinación de tratamientos que generan el comportamiento antes descrito es 1302 de AA con 795 de isoespintanol, con esta combinación de tratamientos se encuentra el punto donde la ΔE^* y actividad enzimática son mínimas. Véase figura 7.

CONCLUSIONES

1. El isoospintanol presenta una buena capacidad para inhibir la actividad de la polifenoloxidasas actuando individualmente.
2. Las sinergias empleadas en este estudio no funcionan como mecanismo para la inhibición de la enzima.
3. La técnica de extracción mediante SEBAS es útil por la gran cantidad de mezclas de polímero/sal que se puede llevar a cabo de acuerdo al material biológico a purificar.
4. La medición del cambio de color normalizado nos permite seguir las reacciones de pardeamiento en matrices alimentarias reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Vinson JA, SU X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49 (11): 5315-5321.
2. Waladkhani AR, Clemens MR. Effect of Dietary Phytochemical on Cancer Development. En: Watson RR editor. *Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion*. Boca Raton FL: CRC Press; 2001. p. 1.1-1.11.
3. Southon S, Faulks R. Health benefits of increased fruit and vegetable consumption. En: Jongen W, editor. *Fruit and vegetable processing Improving quality*. Boca Raton FL: CRC Press; 2000. p. 2.1-2.10.
4. Laurila E, Ahvenainen R. Minimal processing of fresh fruits and vegetables. En: Jongen W, editor. *Fruit and vegetable processing Improving quality*. Boca Raton FL: CRC Press; 2000. p. 14.1-14.14.
5. Ramirez EC, Withaker JR. En: J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen & D.W.S. Wong, editores. *Polyphenol Oxidase: Handbook of Food Enzymology*. Nueva York: Marcel Dekker Inc; 2003. p. 509-523.
6. Friedman M. Food browning and its prevention. and overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44:631-653.
7. Quevedo R, Díaz O, Caqueo A, Ronceros B, Aguilera JM. Quantification of enzymatic browning kinetics in pear slices using non-homogenous L* color information from digital images. *Food Science and Technology* 2009; 42 (8): 1367-1373.
8. Kolcuoglu Y, Colak A, Sesli E, Yildirim M, Saglam N. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry* 2007; 101 (2): 778-785.
9. Whitaker JR. *Principles of enzymology for the food science*. N.Y: Marcel Dekker;1972
10. Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim et Biophys Acta* 1995; 1247 (1): 1-11

11. Alvarez E, de la Rosa LA, Rodrigo GJ, Escobedo GR, Mercado MG, Moyers-ME *et al.* Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food Chemistry* 2007; 101 (4): 1346-1356.
12. Friedman M, Bautista F. Inhibition of polyphenol oxidase by Thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995; 43: 69-76.
13. Sapers GM. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technology* 1993; 10: 75-84.
14. Gacche RN, Zore G, Ghole VS. Kinetics of Inhibition of Polyphenol Oxidase Mediated Browning in Apple Juice by β -Cyclodextrin and L -Ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2003, 18 (1): 1-5.
15. Golan-Goldhirsh A, Whitaker JR. Kcat Inactivation of mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Molecular catalysis* 1985; 32: 141-147.
16. Rocha AM, Morais AM. Influence of controlled atmosphere storage on polyphenoloxidase activity in relation to colour changes of minimally processed "Jonagored" apple. *International Journal of Food Science and Technology* 2001; 36 (4): 425-432.
17. Perez-Gago MB, Serra M, del Rio MA. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology* 2006; 39: 84-96.
18. Olivas GI, Mattinson D, Barbosa-Cánovas GV. Alginate coatings for preservation of minimally processed "Gala" apples. *Postharvest Biology and Technology* 2007; 45: 89-96.
19. Hernández-Munñoz P, Almenar E, Del Valle V, Velez D, Gavara R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*) quality during refrigerated storage quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 2008; 110 (2): p. 428-435.

20. Queiroz C, Mendes ML, Fialho E, Valente-Mequita V. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International* 2008; 24:361-375.
21. Manzocco L, Quarta B, Dri A. Polyphenoloxidase inactivation by light exposure in model systems and apple derivatives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2009; doi:10.1016/j.ifset.2009.02.004.
22. Manzocco L, Anese M, Nicole CN. Radiofrequency inactivation of oxidative food enzymes in model systems and apple derivatives. *Food Research International* 2008; 41: 1044-1049.
23. Griffiths LA. Detection and identification of the polyphenoloxidase substrate of the banana. *Nature* 1959; 184: 58-69.
24. Palmer JK. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology* 1963; 36: 508-513.
25. Sojo MM, Nuñez-Delgado E, García-Carmona F, Sanchez-Ferrer A. Partial Purification of a Banana Polyphenoloxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46: 4924-4930.
26. Yang C P, Fujita S, Ashrafuzzaman MD, Nakamura N, Hayashi N, Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientium* L.) pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 2732-2735.
27. Wuyts N, Waele DD, Swennen R. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 2006, 44: 308-314.
28. Galeazzi M A, Sgarbieri VC, Constantinides SM, Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidase (PPO) from a Dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L.). *Journal of Food Science*, 1981. **46**: p. 150-155.
29. Ünal UM. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*) *Food Chemistry* 2007; 100: 909-913.

30. Altunkaya A, Gokmen V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). Food Chemistry 2008; 107: 1173-1179.
31. Nagai T, Suzuki N, Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001; 49: 3922-3926.
32. Batistuti J P, Lourenco JE. Isolation and purification of Polyphenol Oxidase from a new variety of potato. Food Chemistry 1985; 18: 251-263.
33. Sanchez-Ferrer A, Bru R, García-Carmona F. Novel Procedure for extraction of a latent Grape Polyphenoloxidase Using temperature-Induced phase separation in Triton X-114. Plant Physiology 1989; 91: 1481-1487.
34. Mdluli MK. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). Food Chemistry 2005; 92: 311-323.
35. Chazarra S, Cabanes J, Escribano J, Garcia-Carmona F. Partial Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 1996; 44: 984-988.
36. Wititsuwannakula D, Chareonthiphakorn N, Pavec M, Wititsuwannakulb R. Polyphenol oxidases from latex of Hevea brasiliensis: purification and characterization. Phytochemistry 2002; 61:115-121.
37. GULCIN I, Küfrevioğlu OI, OKTAY M. Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica L.*) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2005; 20 (3): 297-302.
38. Kavrayan D, Aydemir T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). Food Chemistry 2001; 74: 147-154.
39. Anil Kumar VB, Kishor Mohan TC, Murugan K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*). Food Chemistry 2008; 110: 328-333.

40. Fortea MI, López-Miranda S, Serrano-Martínez A, Carreño J, Núñez-Delicado E. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry* 2009; 113:1008–1014.
41. Imm J Y, Kim SC. Convenient partial purification of polyphenol oxidase from apple skin by cationic reversed micellar extraction. *Food Chemistry* 2009; 113: 302–306.
42. Guo L, Ma Y, Shi J, Xue S. The purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *Food Chemistry* 2009; 117 (1): 143-151.
43. Shi C, Day Y, Xu X, Xie Y, Liu Q. The Purification of Polyphenol Oxidase from Tobacco. *Protein Expression and Purification* 2002; 24: 51-55.
44. Mazzafera P, Robinson SP. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 2000; 55: 285-296.
45. Gil MA. Efecto inhibidor del pardeamiento enzimático en el extracto de banano por medio de algunos derivados del isoespintanol. [Tesis de Mestría]. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín; 2007.
46. Rojano B, Perez E, Figadere B, Martin MT, Recio MC, Giner R, et al. Constituents of *Oxandra* cf. *xylopioides* with Anti-inflammatory Activity. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 835-838.
47. Rojano B, Saez J, Schinella G, Quijano J, Vélez E, Gil A, et al., Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *Journal of molecular structure* 2007; 877: 1-6.
48. Dadzie BK, Orchard JE. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. Roma (Italia):1997
49. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Washington, D.C.: AOAC, 1990. 304 p.
50. Vaidya B K, Suthar H.K, Kasture S, Nene S. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal* 2006; 28: 161-166.

51. Bradford MA. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 1976; **72**: 248-254.
52. Pizzocaro F, Torreggiani D, Gilardi G. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and Sodium Chloride. *Journal of Food Processing and Preservation* 1993; **17**: 21-30.
53. Marcus TT. En: Nassau K. editor. *Color for Science, Art and Technology, The Measurement of Color*. K.Nassau. Netherlands: Elsevier; 1998. p. 31-96.
54. Myers RH, Montgomery DC. *Experimental designs for fitting response surfaces - I*, En: *Response surface methodology. Process and product optimization using designed experiments*. N.Y: Wiley; 2002. Wiley p. 303-353.
55. Montgomery DC. *Response surface methods and other approaches to process optimization*. En: *Design and analysis of experiments*. 5a ed. Nueva York: Wiley; 2001. p. 427-500.
56. Marri C, Frazzoli A, Hochkoepler A, Poggi V. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry* 2003; **63**: 745-752.

BIBLIOGRAFIA DE LA INTRODUCCIÓN

AL- ZUBAIDY, M.M.I. & KHALIL, R.A. 2006. Kinetic and prediction studies of ascorbic acid degradation in normal and concentrate local lemon juice during storage. *Food Chemistry*, 101: 254-259.

ALZAMORA, S.M., GUERRERO, S.N., NIETO, A.B. & VIDALES, S.L. 2004. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST) Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura (AGS). FAO, N.Y. 79 p.

AMIOT, M.J., et al. *Phytochemistry of fruits and vegetables*. 1997 En: Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables., Oxford: Clarendon Press. 51-85.

AYAZ, F. A., DEMIR, O., TORUN, H., KOLCUOGLU, Y. & COLAK, A. 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106:291-298.

BALASUBRAMANIAM, D. 2003. Lisozyme Separation from Tobacco Extrac by Aqueous Two -Phase Extraction. Trabajo de grado de Master of Science. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 96 p.

BATISTUTI, J.P. & Euclides, J.L. 1985. Isolation and purification of Poliphenol Oxidase from a New Variety of Potato. *Food Chemistry*, 18: 251-263.

BELITZ, H.D. & GROSH, W. 2004. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza. p.105-172.

BEZERRA, R.P., SOUSA, F.K., BORBA, L., MOREIRA, K.A., LIMA-FHILO, J.L., PORTO, A.L. & CHAVES, A.D. 2006. Extraction of Amylase from Fermentation Broth in Poly (Ethylene Glycol) Salt Aqueous Two-Phase System. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (4): 547-555.

BHALCHANDRA, K.V; HITESH, K.S; SANGITA, K. & SANJAY, J. 2006. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 28: 161-166.

BOHINSKI, R. C. 1991. *Bioquímica*. Adisson Wesley Iberoamericana S.A., Mexico. p.1243

BOTERO, M., RICAURTE, S., MONSALVE, C. & ROJANO, B. 2007. Capacidad Reductora de 15 Frutas Tropicales. *Scientia et Technica*, (33): 295-296.

CALVO, M. 2007. *Bioquímica de los Alimentos*. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html> (consultada en: febrero 11 de 2007).

CONN, E.S., BRUENING, G. & DOI, R. *Bioquímica Fundamental*. 5ta. ed, ed. I. Ed. John Wiley and Sons. 1987., Balderas (México). Noriega Editores. 131-182.

COPELAND, R. A. 1996. *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. WILEY-VCH, Delaware E.U., 306 p.

CHAZARRA, S., CABANES, J., ESCRIBANO, J. & GARCIA-CARMONA, F. 1996. Partial Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 984-988

DAWLEY, R.M., FLURKEY, W. 4-hexylresorcinol, a Potent Inhibitor of Mushroom Tyrosinase. *Journal of Food Science*, 58 (3): 609-613.

DELICADO-NUÑEZ, E., SERRANO-MEGÍAS, M., PÉREZ-LÓPEZ A.J. & LÓPEZ-NICOLÁS, M. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. *Food Chemistry* 100: 108–114.

ENGEL, P.C. 1996 Enzyme Kinetics. in ENGEL, P.C. *ENZYMولوجY*. San Diego, CA: Academic Press: p. 77-112.

ESPIN, J.C., OCHOA, M., TUDELA, J.& GARCIA-CANOAS, F. 1996. Monophenolase Activity Of Strawberry Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry*, 45(4): 667-670.

ESPIN, J.C., TRUJANO, M.F., JOSE, T. & GARCÍA-CANOVAS, F. 1997. Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Haas Avocado *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:1091-1096

FORCINITI, D. 2000. Preparation of Aqueous Two-Phase Systems : p23-45. En: R. H. Kaul (ed.). *Aqueous Two-Phase Systems*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

FRAIGNIER, M.P., MARQUBS,L., FLEURIET, A. & MACHEIX, J.J. 1995. Biochemical and Immunochemical Characteristics of Polyphenol Oxidases from Different Fruits of Prunus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2375-2380

FRANCK, CH., BAETENS M., LAMMERTYN, J., SCHEERLINCK, N., DAVEY, MW., NICOLAI, BM. 2003. Ascorbic acid mapping to study core breakdown development in 'Conference' pears. *Postharvest Biology and Technology*, 30: 133-142.

FRANCO, T.T. & KAUL, R.H. 2000. Single step Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: p. 47-54. En: R. H. Kaul. *Aqueous Two-Phase Systems. Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.

FRIEDMAN, M. B. & BAUTISTA, F.F. 1995. Inhibition of Polyphenol Oxidase by Thiols in the Absence and Presence of Potato Tissue Suspensions. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 43: 69-76.

GACCHE, R.N., ZORE, G.B. & GHOLE, V.S. 2003. Kinetics of Inhibition of Polyphenol Oxidase Mediated Browning in Apple Juice by β -Cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18: 1-5.

GALEAZZI, M. A., SGARBIERI, V.C. & CONSTANTINIDES, S.M. 1981. Isolation, Purification and Physicochemical characterization of Polyphenoloxidases (PPO) from a Dwarf Variety of banana (*Musa cavendishii*, L). *Journal of Food Science*, 46: 150-155.

GIL, M.A. 2007. Efecto Inhibidor del Pardeamiento Enzimático en el Extracto del Banano por medio de algunos derivados del Isoespiritanol. Trabajo de grado Maestría en Ciencias Químicas, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 75 p.

GOLDHIRSH, A. G. a. W., J.R. 1981. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (5): 1003-1009.

GUERRERO BELTRAN, J. A., SWANSON, B.G & BARBOSA-CANOVAS. 2004. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 38: 625-630.

HAMMER, F. E. (1993). Oxidoreductases: p. 221-227. En: T. Nagodawithana & G (eds). *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, San Diego Ca.

HARDING, S. E. & ROWE, A. J. 1996. Purification and analysis of enzyme preparations: p. 9-74. En: P.C.Engel (ed.). *Enzymology*. Academic Press, San Diego CA.

HENCHT, S. *Bioorganic Chemistry*. 1998 N,Y: Oxford university press. 21-26.

HICKS, K.B.; SAPERS, G. M.; AND SEIB, P. A. Process for Preserving Raw Fruit and Vegetables Juice Using cyclodextrins and Compositions thereof, U.S. Patent, 1990. 4: p. 293.

JIMENEZ, M. & GARCÍA-CARMONA, F. 1996. The Effect Of Sodium Dodecyl Sulphate On Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry*, 42(6): 1503-1509.

KAUL, R. H. 2000. Aqueous Two Phase System. A general overview: p. 1-10. En: R. H. Kaul (ed.). *Aqueous Two Phase Systems. Methods and Protocols*. Humana Press, Sweden.

KLABUNDE, T., EICKEN, C., SACCHETTINI, J.C. & KREBS, B. 1998. Cristal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12): 1084-1090.

KLAPP, J., RICHARD, F.C., GOUPY, P.M. & NICOLAS, J.J. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38(4): 926-931.

KORNBERG, A. 1990. Why Purify Enzymes? : p. 1-5. En: M.P. Deutscher (ed.). *Methods in enzymology*. Academic Press, San Diego, Ca.

KUBO, I. & KINST-HORI. 1998. Tyrosinase Inhibitors from cumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5338-5341.

LAURILA, E. and AHVENAINEN R. Minimal processing of fresh fruits and vegetables, 2002. En JONGEN W. *Fruit and vegetable processing. Improving quality*. Cornwall: CRC Press,. p. 288-309.

LEE, M. K. 2007. Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 102: 146-149.

LEHNINGER, 2006. *Principios de Bioquímica*. Editorial Omega, Ciudad. 1500 p.

LOWE, C. R. & THOMAS, J. A. 1996. Purification and Analysis of Enzyme Preparations: p. 9-33. En: P.C.Engel (ed.). *Enzymology*. Academic Press, San Diego Ca.

LU, S., LUO, Y., TURNER, E. & FENG, H. 2007. Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. *Food Chemistry* 104: 824–829.

MAC DOUGALL, D.B. 2002. Colour measurement of food: principles and practice: p. 3.1-3.12. En: D.B. MacDougall (ed.). *Colour in food*. CRC Press, Boca Raton, FL.

MARSHALL, M. R., KIM, J. & eongmok and WEI, C. 2000. Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Sea foods. FAO, Nueva York. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/Ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html> (consultada en abril 11 de 2009).

MARTÍNEZ, J.B. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*. Trabajo de Grado Ingeniería de Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Mexico. 5 p.

MAZZAFERA, P. & ROBINSON, S.P. 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55: 285-296

Mc-EVELILY, A.I., R.; & OTWELL, S. 1991. Inhibition of enzymic browning in food and beverages. *Critical Review in Food Science and Nutrition*,. 32(3): p. 253 - 273.

MOLTO, E. 2007. Medida Práctica del color: p. 1-15. Memorias del Curso: Propiedades Ópticas. 10/10/07. Medellín.

MONTERO, P., AVALOS, A., & PEREZ-MATEOS, M. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 75, 317–324.

NEUGEBAUER, J. M. 1990. Detergents: An Overview: p. 239-277. En: Deutscher M.P. (Ed.). *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. Academic Press, San Diego Ca.

NEVIN-RIDLEY 2009. Enzyme Structures Database. Londres. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/enzymes/> (consultada en abril 11 de 2009).

NILO R.R., 2006. Purificación Parcial Caracterización Cinética de la Polifenol Oxidasa del Cambur Manzano (Musa [AAB]cv. “manzano”). Revista de la Facultad de Agronomía, IX (4):39-49.

OH, S., LEE, Y., LEE, J., KIM, M. R., YOOK, H. & BYUN, M. 2005. The effect of γ -irradiation on the non-enzymatic browning reaction in the aqueous model solutions. Food Chemistry 92: 357–363

OLIVAS, G. I. , MATTINSON, D.S. & BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. 2007. Alginate coatings for preservation of minimally processed ‘Gala’ apples. Postharvest Biology and Technology 45: 89–96.

ONO, E., HATAYAMA, M., ISONO, Y., SATO, T., WATANABE, R., YONEKURA-SAKAKIBARA, K., FUKUCHI-MIZUTANI, TANAKA, Y., KUSUMI, T., NISHINO, T. & NAKAYAMA, T. 2006. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. The Plant Journal 45: 133-143.

OTWELL, W.S.I., R.; AND MCEVILY, A. J. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. . J. Aquat. Food Product Technol., 1992. 1: p. 53 - 65.

PALMER, J. K. 1961. Banana Polyphenoloxidase. Preparation y Properties. Plant Physiology, 36: 508-513.

PAULSON, A. T. & PORRIT, S.W. (1990). Enzymatic browning of peaches: Effect of gibberellic acid and ethephon on pnenolic compound and polyphenoloxidase activity. Journal of Food Science 45(2): 341-345.

PEREZ-GAGO, M.B., SERRA, M. & DEL RÍO, M.A. 2006. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology* 39: 84–92.

PEREZ- GAGO, M.B. 2007. *Frutas y Hortalizas Cortadas en Fresco: definición, calidad, y tecnologías*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Disponible en: www.agro.unalmed.edu.co/ivia/docs/FrutasyHortalizascortadasenfresco.pdf (Consultada en enero de 2009)

PIZZOCARO, F., TORREGGIANI, D. & GILARDI, G. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal and Food Processing and Preservation*, 17: 21-30.

PRICE, N. C., STEVENS, L. 2001. Techniques for enzyme extraction: p. 209-224. En: R. Eisental & M.J. Danson (eds.). *Enzyme Assays*. Oxford University Press, Londres.

QUEIROZ, C., LÓPEZ, M.L.M., FIALHO, E. & VALENTE-MESQUITA, V.L. 2008. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*, 24: 361-375.

RAMIRZ, E.C. & WHITAKER, J.R. 2003. Polyphenol Oxidase: p. 509-523. En: J. R. Whitaker, A.G. J. Voragen & D.W.S. Wong (eds.). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Inc., New York.

RAVINDRA, B.B., RASTOGI N.K., RAGHAVARAO, K.S.M.S. 2008 Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing* 47: 83–89

ROJANO, B., GAVIRIA, C., GIL, A., SÁEZ, J., SCHINELLA, G. & TOURNIER, H. 2008. Actividad Antioxidante del Isoespintanol en Diferentes Medios. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 15(1): 169-177.

ROJANO, B., PEREZ, E., FIGADERE, B., MARTIN, M.T., RECIO, M.C. GINER, R., RIOS, J.L., SCHINELLA, G. & SÁEZ, J. 2007. Constituents of *Oxandra cf. xylopioides* with Anti-inflammatory Activity. *Journal of Natural products*, 70: 835-838.

ROJANO, B., SÁEZ, J., SCHINELLA, G., QUIJANO, J., VÉLEZ, E., GIL, A. & NOTARIO, R. 2007. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol. *Journal of Molecular Structure*, 877: 1-6.

ROSAS ROMERO, A. 2004. La autoxidación y la rancidez oxidativa. *Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales*. Editorial, ciudad. p. 525

ROSSOMANDO, E.F. 1990. Purification Procedures: Chromatographic Methods : p.306-392. En: M. P. Deutscher (ed.). *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego Ca.

TEXEIRA FRANCO, T. 2000. Single-Step Partitioning in Aqueous Two Phase Sstems: p.47-54. En: Rajni Hatti-Kaul. Ed. *Aqueous Two Phase Sstems*. Humana Press, Totowa N.J.

SALVADOR, A., SANZ, T. & FISZMAN, S.M. 2007. Changes in colour and texture and their relationship with eating quality during storage of two different dessert bananas. *Postharvest Biology and Technology* 43: 319–325.

SANCHEZ-FERRER, A, LAVEDA, F. & GARCIA-CARMONA, F. 1993. Partial Purification of Soluble potato Poliphenol oxidase by partitioning in an Aqueous Two-phase Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1219-1224.

SAWAMURA, M., NAKAGAWA, T., KATSUNO, S., HAMAGUCHI, H. & UKEDA, H. 2000. The Effects of Antioxidants on Browning and on Degradation Products Caused by Dehydroascorbic Acid. *Food Chemistry and Toxicology*, 65(1): 20-23.

SOJO, M. M., NUÑEZ-DELICADO, E., GARCÍA-CARMONA, F. & SÁNCHEZ- FERRER, A. 1998. Partial purification of a polyphenol oxidase using Triton X- 114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4924-4930.

SOLIVA-FORTUNY, R. C., ELEZ-MARTÍNEZ, P., SEBASTIÁN- CALDERÓ, M. & MARTÍN-BELLOSO, O. 2002. Kinetics of polyphenol oxidase activity inhibition and browning of avocado purée preserved by combined methods. *Journal of Food Engineering*. 55: 131-137.

SONG, K.K., LIN, J.F., CHEN, Q.X. 2005. Inhibitory effects of 4-isopropylsalicylaldehyde on mushroom tyrosinase. doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.021

ÜNAL, M.U. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100: 909-913.

WESCHE-EBELING, P. & MONTGOMERY, M.W. 1990. Strawberry Polyphenoloxidase: Purification and Characterization. *Journal of Food Science*, 55 (5): 1315-1319.

WESTLAND, S. 2009. Imagen Digital. Barcelona. Disponible en:
http://www.gusgsm.com/categoria_stephen_westland (Consultada en octubre 10 de 2007).

WUYTS, N., WAELE, D.D. & SWENNEN, R. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata Grande naine*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 308-314.

YANG, C., FUJITA, S., ASHRAFUZZAMAN, MD., NAKAMURA, N. & HAYASHI, N. irradiation on the non-enzymatic browning reaction in the aqueous model solutions. *Food Chemistry*. 92: 357–363.

YILDIRIM, H.K. Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines, 2006. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(1/2): 47-63.

ZÍYAN, E. & PEKYARDIMCI, S. 2003. Purification and Characterization of Pear (*Pyrus communis*) Polyphenol Oxidase. *Turk J. Chem.* 28: 547-557.

ANEXOS
INSTRUCCIONES PARA LA PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS

ANEXO A. INSTRUCCIONES PARA AUTORES REVISTA VITAE

Acta 546 de Marzo 11 de 2005

Capítulo 1. Inhibición de la Actividad Enzimática de la Polifenol Oxidasa extraída del Banano (*Cavendish valery*) mediante Sistemas Bifásicos Acuósos con Isoespintanol y Ácido Ascórbico.

Inhibition of Polyphenol Oxidase in Banana (*Cavendish valery*) Extracted using Aqueous Two Phase System with Isoespintanol and Ascorbic Acid.

A. CARACTERÍSTICAS

1. La Revista VITAE es una publicación oficial de la Facultad de Química Farmacéutica, de periodicidad semestral, y tiene como misión la divulgación del pensamiento científico y el quehacer a nivel investigativo en los diversos campos de las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines.

2. Posición de la revista. La opinión de la Facultad frente a los diversos temas de interés se consigna a través de sus páginas editoriales. La responsabilidad por los juicios, opiniones y puntos de vista expresados en los artículos publicados corresponde exclusivamente a sus autores.

3. Reserva de derechos. El estudio y la selección de los artículos enviados por los colaboradores para su publicación en la revista, están a cargo del Comité Editorial y el Comité Científico. La recepción de un trabajo no implica su publicación ni el compromiso por parte del Comité Editorial con respecto a su fecha de aparición; así mismo, se reserva el derecho de realizar las modificaciones editoriales que a su juicio sean necesarias para la publicación en la revista. Los artículos deben ser originales e inéditos y se publicarán en estricto orden de recepción y aprobación. Antes de la publicación de un artículo, uno de sus autores deberá firmar una carta donde declare que el contenido de dicha publicación no es ni será publicado en otra revista.

B. CLASES DE ARTÍCULOS

La Revista VITAE publicará las siguientes clases de artículos:

Revisiones

Artículos Completos

Artículos Cortos

Clasificación de artículos

Todos los artículos serán clasificados en alguna de las siguientes secciones:

- Ciencias básicas.
- Ingeniería y Tecnología de Alimentos.
- Atención Farmacéutica.
- Biotecnología.
- Farmacología y Toxicología.

- Industrial farmacéutica.
- Productos Naturales.

Otras secciones:

- Cartas al Editor
- Notas académicas y profesionales
- Preguntas y respuestas

En Otras Secciones sólo se publicará una colaboración por cada modalidad.

C. INSTRUCCIONES PARA PRESENTAR LOS ARTÍCULOS

Presentación: Todo artículo debe ceñirse a las normas de publicación de artículos del último número de la revista. Los trabajos enviados para su publicación deben dirigirse a la Secretaría de la Facultad de Química Farmacéutica: un original y dos copias en papel; con márgenes simétricas de 2,5 cm; a doble espacio en su totalidad. Además, se debe acompañar de una copia en medio magnético, en Word bajo Windows®. El texto debe digitarse sin formato, utilizando tipo de letra Times New Roman con tamaño de 12 puntos. Se admite la copia magnética enviada por correo electrónico, mientras se remita el original en papel impreso con todas las especificaciones antes mencionadas.

El artículo debe acompañarse de la hoja de vida actualizada del autor o autores; además especificar lo siguiente: si fue derivado de una investigación, cuál es el nombre del proyecto de investigación incluyendo su fecha de inicio y culminación, entidad que lo financió y si tiene algún programa de investigación asociado, cuál es éste.

Cada uno de los autores debe suscribirse a la revista cuando sea aprobada la publicación de su artículo.

En la primera página de todos los artículos deben aparecer: título del trabajo (en español e inglés) y autores (primer nombre completo e inicial del segundo y primer apellido en mayúscula e inicial del segundo). En el pie de página debe aparecer la institución a la que pertenece cada uno de los autores, incluyendo la dirección física, y el correo electrónico del autor a quien se debe dirigir la correspondencia.

Resumen: Se debe incluir un resumen y un abstract (máximo de 200 palabras), que deben estar redactados en tiempo presente, en un sólo párrafo y deben contener:

1. Presentación del tema
2. Una hipótesis
3. Uno o dos argumentos
4. Resultados
5. Conclusiones

En los resúmenes no deben usarse referencias y se recomienda no incluir siglas ni acrónimos.

A continuación se deben incluir hasta cinco palabras clave en español e inglés, las cuales deben consultarse en los Descriptores de Ciencias de la Salud (Decs) del índice de Literatura latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) (<http://decs.bvs.br>).

Revisiones: Son documentos donde se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones, publicadas o no, sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de sus avances y las tendencias en su desarrollo. Deben tener una extensión máxima de 25 páginas.

Los trabajos de revisión estarán dedicados a estudios de actualización sobre un tema específico, bien documentados, y realizados por expertos en el tema. Debe incluir la evolución del área durante un período de tiempo y las perspectivas de su desarrollo con énfasis en el significado de los hallazgos recientes.

Deben presentar una descripción general del campo en cuestión, con una evaluación crítica de su desarrollo.

La estructura y encabezamiento de los trabajos de revisión quedan a criterio del autor, si bien el Comité Editorial puede sugerir cambios que mejoren la edición. Las referencias bibliográficas seguirán las reglas establecidas para los artículos originales completos y deben estar actualizadas, con un mínimo de 50 referencias bibliográficas citadas en el texto. En la introducción del artículo se debe definir un período de revisión bibliográfica no inferior a un año y las fuentes de información consultadas.

Artículos completos: En estos se publicarán los resultados, análisis y conclusiones de mayor alcance en el campo de las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines, que no hayan sido publicados previamente.

Cuando se trate de estandarización de métodos analíticos, éstos deben ser validados bajo normas internacionales.

Tendrán una extensión máxima de 25 páginas, incluyendo tablas, figuras y referencias bibliográficas.

En los trabajos experimentales se deben presentar los siguientes apartados:

1. *Introducción*, en la cual se expondrán los fines y objetivos; se hará referencia explícita a todo trabajo anteriormente publicado por el mismo autor o por otro, si el conocimiento de esos trabajos es esencial para situar al lector en el desarrollo del texto presentado.

2. *Una parte experimental o de materiales y métodos*, que sólo contendrá los datos necesarios para la reproducción de los experimentos.

3. *Resultados*.

4. *Discusión de resultados*.

5. *Agradecimientos*, cuando se considere necesario.

6. *Referencias bibliográficas*.

Artículos cortos: En estos se publicarán los resultados, análisis y conclusiones definidas y rigurosas, pero limitados aún en su alcance, de aquellos trabajos relacionados con las ciencias farmacéuticas alimentarias y afines, cuyo interés justifique que se tenga información sobre el tema.

Tendrán una extensión máxima de 15 páginas, incluyendo tablas, figuras y referencias bibliográficas. La estructura será la misma que para los Artículos Completos. Se recomienda en estos casos presentar un solo apartado para Resultados y Discusión.

Referencias bibliográficas: Las referencias deben colocarse al final del artículo, dándoles números correlativos según el orden en que aparezcan por primera vez en el texto; se identificarán en el texto mediante números arábigos entre paréntesis.

Deben estar ordenados numéricamente bajo el título Referencias Bibliográficas, de acuerdo con las normas Vancouver.

En las referencias con más de seis autores se mencionan los seis primeros seguidos de la abreviatura *et al.*

• **Artículos de revistas**

– Artículos estándar:

Autor/es. Título del artículo. Nombre abreviado internacional de la revista Año; volumen (número): página inicial-final del artículo.

Giraldo GA, Duque A, García C. Métodos combinados de secado para el escarchado de mango (*Mangifera indica*) var. Kent. Vitae 2006; 12 (2): 5-12.

• **Libros y otras monografías**

La primera edición no es necesario consignarla.

La edición siempre se pone en números arábigos y abreviatura: 2ª ed.

– Estándar: Autor/es. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año.

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 20 ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

– Editor(es), compilador(es) como autores

Norman IJ, Redfern SJ, editores. Mental health care for elderly people. Nueva York: Churchill Livingstone; 1996.

– Organización como autor y editor

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid programme. Washington (DC): El Instituto; 1992.

– Capítulo de libro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editores. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 20 ed. Nueva York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

• **Documentos legales**

País, departamento o jurisdicción. Nombre de la entidad que expidió el documento legal. Título de la ley, decreto, acuerdo, etc., y el motivo de expedición.

Ciudad: Entidad que la publicó; año.

Colombia. Ministerio de Salud. Decreto 3075 de 1997, diciembre 23, por el cual se reglamenta la ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones. Bogotá: El Ministerio; 1997.

• **Referencias bibliográficas de congresos, conferencias, etc.**

Autor/es. Título de la ponencia. En: Título oficial del Congreso. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial-final de la ponencia.

• **Referencias bibliográficas de tesis y trabajos de investigación**

Autor/es. Título de la tesis. [Tesis Doctoral]. Lugar de edición: Editorial; año.

• **Artículos de periódicos**

Autor/es (si figura). Título del artículo. Nombre del periódico (no abreviado) año mes día; Sección: página (columna).

• **Material audiovisual**

Autor/es. Título del material. [video]. Lugar de edición: Editorial; año.

• **Material electrónico**

– Artículo de revista en formato electrónico:

Autor/es. Título. Nombre abreviado de la revista [tipo de soporte (en línea, archivo de computador, etc.)] año [fecha de acceso]; volumen (número): páginas o indicador de extensión. Disponible en: <http://>.

Morse SS. Factors in emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial en línea] 1995 [citado 1996 Jun 5]; 1(1): 24 pantallas. Disponible en: <http://www.cdc.gov/nclod/EID/eid.htm>

– Documentos en formato electrónico

Autor/es. Título. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://>. Consultado:

Organización de las Naciones Unidas. Declaración Universal de los Derechos Humanos. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.un.org/spanish/aboutun/hrights.htm>. Consultado: 20 de junio de 2005.

– Archivo de computador

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics (programa de computador). Versión 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Tablas y figuras: Cada artículo debe ser complementado con sus respectivas tablas y figuras previamente referidas en el texto, así: (Véase tabla 3) y (Véase figura 1), y deben ubicarse después del párrafo en que son citadas por primera vez.

Se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Las tablas y figuras serán numeradas en el orden en que aparecen citadas en el texto, utilizando números arábigos. En las tablas se incluyen cuadros y en las figuras todas las ilustraciones como fotografías, dibujos y gráficos.
- No usar colores ni sombras ni en las gráficas ni en las figuras.
- Los datos que aparecen en las tablas y figuras no deben duplicarse en el texto
- El número de figuras se limitará al mínimo, procurando yuxtaponer aquellas gráficas que sin perjuicio de la claridad, pueden referirse al mismo sistema de coordenadas.
- Todas las tablas y figuras deben contener la fuente de donde han sido tomadas; si ésta no aparece se asumirá que son creación del autor.
- El título de las figuras se digita como un párrafo ordinario fuera de la figura en la parte inferior y el título de las tablas en la parte superior.

Símbolos: El autor debe tener en cuenta en la redacción las Normas del Sistema Internacional (SI), en lo referente a unidades, símbolos y abreviaturas.

Nombres comerciales: Se evitará el empleo de nombres comerciales; en su lugar se utilizarán los genéricos, pero si es inevitable, se indicará con el símbolo ®.

D. REVISIÓN DE ORIGINALES

El Comité Editorial revisará los originales, se asesorará, cuando lo requiera, de personal adecuadamente calificado y devolverá a los autores aquellos cuyo contenido no se ajuste a las presentes normas, solicitando, en todo caso, las modificaciones que estime oportunas.

Selección. El Comité Editorial remitirá todos los artículos que cumplan las normas editoriales como mínimo a dos árbitros, quienes deben emitir su concepto por escrito en el formato establecido para ello. Si los árbitros sugieren correcciones, los autores deberán enviar la nueva versión por duplicado acompañada del medio magnético en un plazo máximo de doce días a partir de la fecha de envío, pasado el cual perderá su turno de publicación. En la corrección de pruebas de impresión final, que deberá realizarse con gran atención, no se admitirán modificaciones al texto original.

Por último, a todo autor principal se le retribuirá por su colaboración con tres ejemplares del número de la revista en el cual fue publicado su artículo.