

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO DE LA UVA CAIMARONA (*Pourouma cecropiifolia*) A DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA Y LA PEROXIDASA

Carlos Eduardo Narváez Cuenca*, Patricia Restrepo**

Recibido: 30/09/02 Aceptado: 11/12/02

Palabras clave: polifenoloxidasas, peroxidasa, *Pourouma cecropiifolia*, pardeamiento, maduración, frutas amazónicas, lesiones por frío, uva caimarona.

Key words: Polyphenoloxidase, peroxidase, *Pourouma cecropiifolia*, browning, Ripening, Amazon's fruits, chilling injury, uva caimarona.

RESUMEN

La uva caimarona, uno de los frutos promisorios de la Región Amazónica, se destaca por su color, su sabor y por su corto tiempo de vida en anaquel, en el que el pardeamiento contribuye al rápido deterioro de este fruto. Este pardeamiento es producido probablemente por enzimas como polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD), propias del fruto. Tras la caracterización de POD se hallan valores de K_M , a pH 6,0 y 37 °C, de 10,0 mM para guayacol y 0,17 mM para H_2O_2 . El valor de K_M con L-Dopa para PFO es 2,70 mM, evaluado a pH 7,0 y a 37 °C. El pH óptimo de 6,0 para Peroxidasa y de 7,0 para Polifenoloxidasas y, la mayor termoresistencia de Peroxidasa está de acuerdo con lo obtenido por otros investigadores en este tipo

de enzimas, extraídas de tejidos vegetales. Al refrigerar los frutos a 1 °C la actividad enzimática se hace máxima luego de 24 horas de iniciado el tratamiento. Esta actividad está en relación directa con el pardeamiento que manifiestan los frutos y con el máximo observado en la intensidad respiratoria. A 25 °C la actividad enzimática se hace máxima luego de dos días de almacenamiento, momento que coincide con la madurez sensorial de los frutos y con el máximo climático; al final, la actividad de POD y la respiración se incrementan indicando que el fruto está próximo a morir. El comportamiento a 20 °C es similar al observado a 25 °C, con un desplazamiento en los máximos de tres días. Tras la reducción de la temperatura de almacenamiento, en 5 °C se logra retardar el metabolismo del fruto con lo que se consigue prolongar su vida útil en tres días.

ABSTRACT

Uva caimarona, one of the most promissory fruits in the Amazon's region, stand out by its short life period in shelf when browning deteriorates the fruit in a fast way. Enzymes such as Polyphenoloxidase (PPO)

* Profesor Asistente. Universidad de la Amazonia, hematita@latinmail.com

** Profesor Asociado. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, parestre@ciencias.unal.edu.co

and Peroxidase (POD) contribute to the browning of vegetable tissues. The kinetics parameters for PPO and POD is evaluated in uva caimaron's fruits. Values of V_{max} , obtained in similar conditions for POD are 6.67 U/mg for guaiacol and 7.14 U/mg for H_2O_2 . The V_{max} for PPO is 0.27 U/mg. The pH optimum is 6.0 for POD and 7.0 for PPO. Moreover, the highest POD thermal stability is similar to the results obtained by other scientist. POD shows decreasing up to 10.0 mM of H_2O_2 in its activity.

Enzymatic activity in fruits that have been chilling at 1 °C becomes highest 12 hours after beginning the treatment. This activity is directly related to the browning that fruit shows and the maximum level in respiratory intensity. At 25 °C the enzymatic activity becomes greater after two storage days, coinciding with fruit's sensorial maturity and the highest climateric. At the end, POD activity and CO_2 production increase showing that the fruit is closed to death. Behavior at 20 °C is similar to the one at 25 °C, with a movement in the patterns of three days. After lowering at 5 °C storage temperature, fruit's metabolism is lagged, enlarging its useful life up to three days.

INTRODUCCIÓN

La uva caimaron (*Pourouma cecropiifolia*), originaria de la Región Amazónica, es una drupa ovalada globosa. Se caracteriza por ser una buena fuente de K, P, Ca y Mg y por su exquisito sabor (1). Sin embargo, es altamente perecedera; razón por la cual, sólo es comercializada en la Región Amazónica, su lugar de origen. Con el ánimo de ampliar el mercado del

producto se debe prolongar su tiempo de vida. La refrigeración surge como una tecnología de conservación económicamente rentable; no obstante, hay que tener cuidado con temperaturas muy bajas ya que se pueden generar lesiones por frío, caracterizadas principalmente por la aparición de manchas oscuras (2).

El pardeamiento de los frutos, durante la maduración y en la producción de lesiones por frío, genera pérdidas importantes en las características sensoriales y nutricionales. En la producción de este pardeamiento juegan un papel importante la polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1, PFO) y la peroxidasa (EC 1.11.1.7, POD) (3, 4, 5, 6, 7, 8). Ambas enzimas están involucradas en mecanismos de respuesta a lesiones, ya sean causadas por medios físicos, choques térmicos: altas o bajas temperaturas, o por procesos infecciosos. Estas enzimas generan sustancias que inhiben el desarrollo microbiano y polímeros de altos pesos moleculares, que constituyen una barrera física frente a agentes invasores y que permiten la cicatrización de tejidos lacerados (9).

La polifenoloxidasas es una metaloenzima que contiene cobre. En la célula, está ubicada en las membranas de los tilacoides en los cloroplastos, en las mitocondrias y en fracciones solubles (10). Esta enzima cataliza la ortohidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad cresolasa) y la oxidación de los o-difenoles a o-quinonas (actividad catecolasa) (11). Las quinonas formadas pueden reaccionar con fenoles, con otras quinonas, con aminoácidos y proteínas generando pigmentos de color café, con la consiguiente reducción del valor sensorial y nutricional de algunos productos (12).

La peroxidasa es clasificada como una hemoproteína. Se encuentra en los peroxisomas, en los cloroplastos, en las vacuolas y en la pared celular (13, 14). Además de intervenir en el pardeamiento enzimático y en los procesos infecciosos, está relacionada con la elongación de la raíz (15), con los procesos de lignificación de la pared celular y con la protección de la célula contra daños oxidativos causados por el H_2O_2 (14). Esta enzima cataliza la deshidrogenación de un amplio número de sustratos que pueden ser encontrados en la célula, con la transferencia del hidrógeno del donador al H_2O_2 . Se ha comprobado su efecto sobre L-Dopa, betalainas y flavonoides que efectivamente se encuentran en las vacuolas de las células (14, 16, 17).

Aunque la actividad de estas enzimas se ha investigado en diversos vegetales, es poco lo que se conoce sobre su actividad en frutos de la Región Amazónica. Este trabajo se plantea con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de medida de la actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa en frutos de uva caimarona (*Pourouma cecropiifolia*) y de estudiar la relación existente entre la intensidad respiratoria, la evolución de las características sensoriales y la actividad de PFO y POD durante el almacenamiento del fruto fresco de *Pourouma cecropiifolia* a diversas temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutas de uva caimarona. Son adquiridas de cultivos semitecnificados, en Corpoica Macagual, ubicado a 20 km de Florencia, Caquetá (25 °C, 85% HR), en la Amazonia colombiana. La selección se efectúa por sanidad, apariencia general,

estado de madurez (entre 5 y 10% de color rojo en corteza). Luego se realiza una desinfección por inmersión en hipoclorito de sodio 2% durante 20 min. Las frutas, en ramillete, son almacenadas a 1, 20 y 25 °C, a una humedad relativa de 85% durante seis días. En las frutas maduras a 25 °C se evalúan las mejores condiciones de medida de actividad de PFO y POD. En las frutas almacenadas a las tres diferentes temperaturas se mide, cada 12 horas, la intensidad respiratoria y cada 24 horas las características sensoriales y la actividad enzimática.

Evaluación de las condiciones óptimas para la determinación de la actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa.

En el laboratorio de frutas tropicales de la Universidad Nacional de Colombia, se evalúa el efecto de la concentración de sustrato (y de la del donador de protones para la peroxidasa), del pH y de la temperatura sobre la actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa.

Preparación del extracto enzimático.

Las frutas, en ramillete, son almacenadas a condiciones ambiente de Florencia (25 °C y humedad relativa de 85%). Una vez maduras, se retira la semilla de las frutas y el conjunto corteza más pulpa se congela en aire líquido y se lava con acetona a -20 °C para eliminar pigmentos y fenoles presentes en el fruto. Las proteínas del residuo de la filtración son extraídas con buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8 más $CaCl_2$ 0,1 M, con agitación durante 24 horas. Las proteínas solubilizadas son precipitadas con $(NH_4)_2SO_4$ al 80% de saturación, con agitación durante 1 hora, reposo durante 24 horas y separación por centrifugación a 18000g por 30 min. El pélet se dializa contra agua destilada hasta fin de Cl^- y de

SO_4^{2-} . Todo el proceso se realiza a una temperatura máxima de 4 °C. La proteína en el extracto dializado es cuantificada por el método microkjeldahl.

Evaluación del efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de polifenoloxidasas. Se toman 75 µL de extracto enzimático que contienen 0,060 mg de proteína, 100 µL de buffer fosfatos 0,1 M pH 7,0 y 75 µL de L-Dopa para proporcionar concentraciones de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 y 7,0 mM y completar a 250 µL. Los reactivos y la mezcla de reacción son incubados a 37 °C. Se sigue la aparición de las quinonas formadas a partir de L-Dopa por acción de la enzima a 410 nm, a intervalos de 30 s durante 5 min. Una unidad de PFO se define como el cambio en una unidad de absorbancia por minuto. La actividad específica es igual a la unidad enzimática por mg de proteína (8).

Evaluación del efecto de la concentración del sustrato y del donador de protones sobre la actividad de peroxidasa. Para evaluar el efecto de la concentración de guayacol (sustrato) se toman 25 µL del extracto enzimático, equivalentes a 0,020 mg de proteína. Se adicionan 100 µL de buffer fosfatos 0,1 M, pH 6,0; 25 µL de H_2O_2 50 mM, de tal forma que su concentración en la mezcla de reacción es 5 mM y 100 µL de guayacol de concentraciones iniciales 2,5; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 y 200,0 mM, para proporcionar concentraciones en la mezcla de reacción de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 y 80,0 mM. El volumen de la mezcla de reacción es 250 µL. Los reactivos y la mezcla de reacción son incubados a 37 °C.

Posteriormente se evalúa el efecto de la concentración de H_2O_2 (donor de protones) para lo cual se toman 25 µL del extracto enzimático. Se adicionan 100 µL de buffer fosfatos 0,1 M, pH 6,0; 100 µL de guayacol 100,0 mM, de tal forma que su concentración en la mezcla de reacción es 40 mM, y 25 µL de H_2O_2 de concentraciones iniciales 0,250; 0,500; 1,00; 5,00; 10,0; 50,0; 100; 200 y 400 mM, para proporcionar concentraciones en la mezcla de reacción de 0,025; 0,050; 0,100; 1,00; 5,00; 10,0; 20,0 y 40,0 mM. El volumen de la mezcla de reacción es 250 µL. Los reactivos y la mezcla de reacción son incubados a 37 °C.

Tanto en la evaluación del efecto del sustrato como del donador de protones se hacen lecturas de absorbancia a 440 nm cada 30 s durante 5 min. Una unidad de POD se define como el cambio en una unidad de absorbancia por minuto (18). La actividad específica es igual a la unidad enzimática por mg de proteína.

Efecto del pH. Para PFO se evalúa sobre 0,060 mg de proteína a una concentración de L-Dopa 7,0 mM. Para POD se emplean 0,020 mg de proteína a una concentración de guayacol de 40,0 mM y de H_2O_2 de 5,0 mM. Se usan soluciones amortiguadoras a valores de pH entre 2,0 y 9,0 a intervalos de una unidad de pH: glicina-HCl pH 3,0; citrato-ácido cítrico pH 4,0 y 5,0; fosfatos pH 6,0 y 7,0; Tris-HCl pH 8,0 y 9,0; todos 0,1 M. Los reactivos y la mezcla de reacción son incubados a 37 °C. Las condiciones de la lectura espectrofotométrica son iguales que en la evaluación del efecto del sustrato.

Efecto de la temperatura. Para PFO se emplean 0,060 mg de proteína con

L-Dopa 7,0 mM en buffer fosfatos pH 7,0; para POD el efecto se evalúa sobre 0,020 mg de proteína a una concentración de guayacol de 40,0 mM y de H_2O_2 de 5,0 mM en buffer fosfatos pH 6,0. Los reactivos y la mezcla de reacción son termostatados entre 0 y 80 °C, a intervalos de 10 °C, a pH 7,0. Se incluye incubación a 37 °C. Las medidas espectrofotométricas se realizan en un espectrofotómetro UV-VIS, Perkin Elmer, modelo λ -15.

Intensidad respiratoria. Se evalúa cada 12 horas, por reacción del CO_2 con $Ba(OH)_2$ y titulación del exceso de base con HCl (19) en la Universidad de la Amazonia. Los ensayos se hacen por triplicado. El análisis se plantea en un diseño factorial de temperatura y tiempo de almacenamiento. Se efectúa el análisis de varianza de acuerdo al diseño experimental escogido. Se comparan los promedios de tratamientos a través de la prueba de Tuckey.

Evaluación sensorial. Se evalúa, cada 24 horas, la evolución del color de la fruta entera y el color y la apariencia de la pulpa por el Método de Puntajes a través de un panel entrenado en evaluación sensorial de alimentos, conformado por seis panelistas en la Universidad de la Amazonia. Para evaluar el tiempo de vida útil de los frutos se emplea la prueba de Friedman (20). Para comparar el efecto de la temperatura se compara la diferencia entre rangos de tratamientos por la prueba de Kruskal-Wallis. En donde al menos un tratamiento es diferente, se aplica la prueba de la diferencia mínima significativa (20).

Medida de la actividad enzimática en los tratamientos. La actividad de las

dos enzimas es evaluada en los frutos almacenados a 1, 20 y 25 °C durante seis días a intervalos de 24 horas a las mejores condiciones de medida. Los extractos enzimáticos y la cuantificación de proteína se realiza de la misma manera como en la puesta a punto de la actividad enzimática. Las lecturas de actividad se hacen por duplicado.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Evaluación de las condiciones óptimas para la determinación de la actividad de polifenoloxidas y peroxidasa. En la figura 1 se ilustra el efecto de la concentración de L-Dopa sobre la actividad de PFO. Los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para PFO extraída de uva caimaron son 2,70 mM y 0,27 U/mg; el valor de K_M para PFO de la fruta en estudio muestra una menor afinidad por el sustrato que la extraída de champiñones ($K_M = 0,245$ mM) (3), Dog-rose ($K_M = 6,06 \times 10^{-4}$) (4), pulpa de lulo ($K_M = 1,21$ mM) y corteza de lulo ($K_M = 1,04$ mM) (8), y mayor afinidad que la extraída de pera ($K_M = 8,9$ mM) (5).

Al evaluar el efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la actividad de POD,

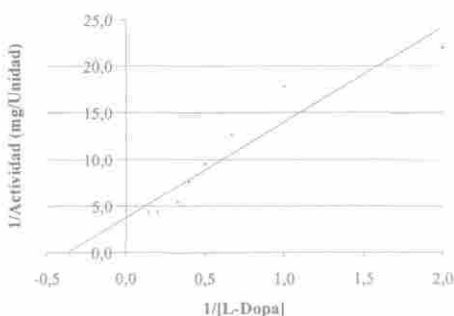


Figura 1. Efecto de la concentración de L-Dopa sobre la actividad de PFO – Representación de Lineweaver – Burk.

se halla que en concentraciones superiores a 10 mM la actividad enzimática se ve inhibida (datos no mostrados); por tanto, para la evaluación de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ se tienen en cuenta las actividades hasta 7,5 mM. En las figuras 2a y 2b se ilustran las representaciones de Lineweaver-Burk para el efecto de la concentración de H_2O_2 y de guayacol sobre la actividad de POD. A 10,0 mM de H_2O_2 , la actividad representa un 73% de la obtenida a 7,5 mM; a 40 mM, la actividad representa un 42%. Esto sugiere que el H_2O_2 puede estar oxidando aminoácidos de la proteína, que hacen que su sitio activo se modifique y pierda su actividad.

Tras la evaluación del intercepto en los ejes cartesianos, se obtiene para H_2O_2 , $K_M = 0,17$ mM y $V_{m\acute{a}x} = 7,14$ U/mg y, para guayacol, $K_M = 10,0$ mM y $V_{m\acute{a}x} = 6,67$ U/mg. La POD aquí investigada exhibe afinidades para H_2O_2 superiores, entre 10 y 70 veces mayor, a las encontradas en arveja verde ($K_M = 2,6$; 4,3 y 7,2 mM para tres isoenzimas) (6) y en pera ($K_M = 1,5$ mM) (7). El valor de K_M para guayacol,

obtenido aquí, es inferior al reportado en pera ($K_M = 45,0$ mM) (5) y en arveja verde ($K_M = 10,2$; 10,2 y 10,8 mM para tres isoenzimas) (6). De acuerdo con los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos para PFO y POD en uva caimaron es probable que el deterioro y, en especial, el pardecamiento de la fruta sea debido a la actividad de estas dos enzimas.

Los resultados del efecto del pH sobre la actividad de PFO y de POD se muestran en la figura 3. La actividad de PFO es máxima a pH 7,0, mientras que la de POD se hace máxima a pH 6,0. Resultados similares se reportan para PFO extraída de pera, pH 7,0 (5), de corteza y pulpa de lulo, pH 7,0 (8), de papaya, pH 6,5 (21), y de piña, pH 6,5-7,0 (22). En repollo, el pH de máxima actividad de esta enzima es superior, pH 7,6 (23). Para POD extraída de arveja verde, el valor de máxima actividad está entre 4,5 y 6,0 (6); en repollo es 6,4, evaluado con fluoroglucinol como sustrato (23).

La evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de PFO y de POD se

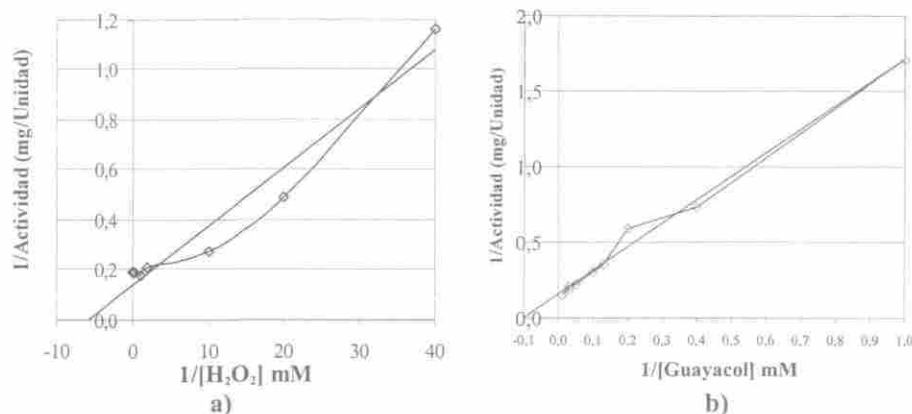


Figura 2. Efecto de la concentración de a) H_2O_2 y de b) guayacol sobre la actividad de POD – Representación de Lineweaver - Burk

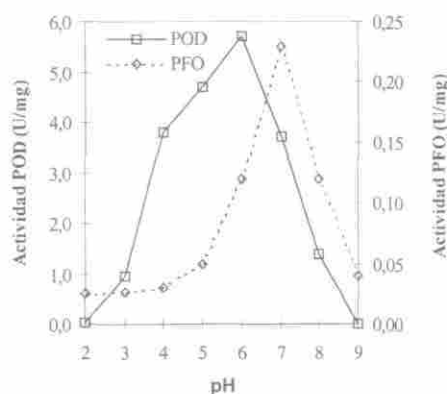


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad de POD y de PFO.

muestra en la figura 4. La actividad de PFO es estable entre 30 y 40 °C. A 0 °C la actividad disminuye en aproximadamente 4 órdenes de magnitud. La PFO es inactivada a temperaturas superiores a 60 °C. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado para PFO de repollo, en el que a 50 °C la actividad representa el 20% de la máxima obtenida a 40 °C (23), y para PFO de corteza de manzana, que es inactivada rápidamente a temperaturas superiores a 50 °C (24). Por el contrario, en PFO extraída de corteza y pulpa de lulo la actividad no se ve afectada por efecto de la temperatura, evaluada entre 20 y 80 °C (8).

La POD es más termorresistente que la PFO: a 60 °C la actividad de POD representa el 54% de la máxima, obtenida a 37 °C, mientras que a la misma temperatura, la actividad de PFO representa sólo el 4% de la máxima, obtenida también a 37 °C.

Intensidad respiratoria. En la figura 5 se observa que la intensidad respiratoria del fruto de *Pourouma cecropiifolia* a 25

°C tiene la tendencia típica de un fruto climatérico con un incremento gradual en la intensidad respiratoria hasta llegar a un máximo 48 horas después de cosechado. Luego, esta intensidad disminuye. A partir del cuarto día se presenta un nuevo incremento en la intensidad respiratoria, que puede ser indicativo de la actividad de microorganismos. Al disminuir la temperatura en 5 °C, la respiración del fruto disminuye y el máximo respiratorio se desplaza de dos a cinco días. A 1 °C se presenta un máximo en la intensidad respiratoria, de menor intensidad al observado a 20 y a 25 °C. El efecto de la temperatura y del tiempo de almacenamiento es altamente significativo y, de acuerdo con la prueba de Tuckey, la intensidad respiratoria se hace mayor de forma altamente significativa al incrementar la temperatura.

Cambio de las características sensoriales. Sobre los resultados del color del fruto entero y del color y la apariencia de la pulpa de los frutos, almacenados a 1, 20 y 25 °C, en función del tiempo de almacenamiento se hace una comparación de la suma de rangos de acuerdo con la prueba de Friedman, en que se

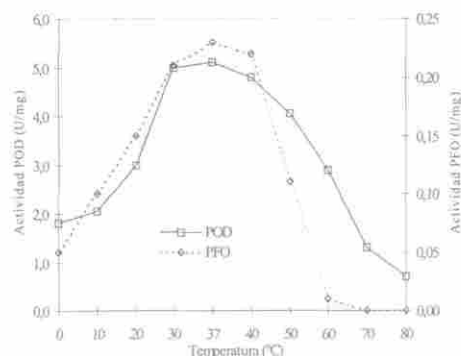


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de POD y de PFO.

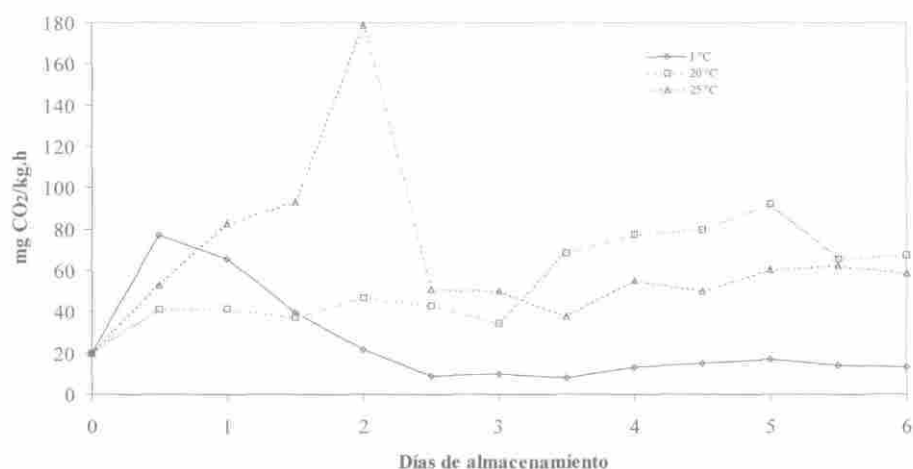


Figura 5. Intensidad respiratoria de los frutos de *Pourouma cecropiifolia* almacenados a 1, 20 y 25 °C durante seis días.

encuentra que en todos los casos al menos un tratamiento es diferente. Los resultados se consignan en la tabla 1. A 25 °C el color

del fruto entero y el color y la apariencia de la pulpa alcanzan valores muy cercanos a los máximos otorgados en los factores de

Tabla 1. Evaluación sensorial del fruto entero y de la pulpa de *Pourouma cecropiifolia* almacenado a 25, 20 y 1 °C y H.R. 85%

Día	Suma de rangos					
	Color del fruto entero			Color y apariencia de la pulpa		
	25 °C	20 °C	1 °C	25 °C	20 °C	1 °C
0	160,5	76,5	213,5	195,0	157,5	212,5
1	197,5	75,5	193,5	194,0	127,5	192,0
2	237,0	132,0	161,0	204,0	91,5	181,5
3	103,5	167,0	125,0	117,6	171,5	139,5
4	101,0	196,0	86,5	100,0	155,0	99,0
5	76,0	232,0	81,5	68,5	151,5	57,5
6	27,5	24,0	42,0	24,0	48,5	21,0

Los resultados sombreados, dentro de una columna, son significativamente iguales al valor más alto, de acuerdo con la prueba de Friedman.

calidad a los dos días, mientras que a 20 °C estas características son máximas luego de cinco días. El color de la corteza y el color y la apariencia de la pulpa decaen de manera significativa a partir del tercer día, a 25 °C, y del sexto día a 20 °C. Los máximos respiratorios observados a 25 y a 20 °C (figura 5) corresponden a máximos climáticos puesto que coinciden con los máximos en las características sensoriales de los frutos.

En las frutas refrigeradas a 1 °C se presenta pardeamiento de la corteza y de la pulpa a pocas horas de iniciado el tratamiento. En ningún momento estas características sensoriales alcanzan el valor máximo asignado en los factores de calidad; el daño se hace más notorio al incrementar la exposición al frío, de forma que las calificaciones de estas características sensoriales tienden siempre a disminuir. Por lo anterior, el máximo respiratorio observado en las frutas almacenadas a 1 °C (figura 5) no corresponde a un máximo climático, sino que es una manifestación de las lesiones por frío, en donde el metabolismo es acelerado durante las primeras 12 horas de exposición al frío, sin que se

lleven a cabo de forma adecuada los procesos de maduración del fruto.

Al comparar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el color del fruto entero y el color y la apariencia de la pulpa (figura 6), se aprecia que a 1 °C esta característica tiende a permanecer por debajo de la de los frutos almacenados a 20 y a 25 °C. Durante los dos primeros días la calidad de los frutos a 25 °C es superior a la de los frutos almacenados a 1 y a 20 °C debido a que durante este periodo los frutos a 25 °C maduran, mientras que a 1 °C se generan lesiones por frío y a 20 °C los frutos aún no están maduros. A partir del tercer día la calidad de los frutos almacenados a 20 °C es significativamente superior a la de los otros dos tratamientos, ya que a 25 °C los frutos inician su senescencia y a 1 °C las lesiones por frío continúan avanzando.

Actividad enzimática. Una vez determinado que las frutas almacenadas a 20 y 25 °C maduran de forma adecuada y que a 1 °C se manifiestan lesiones por frío, se estudia el comportamiento de PFO y de

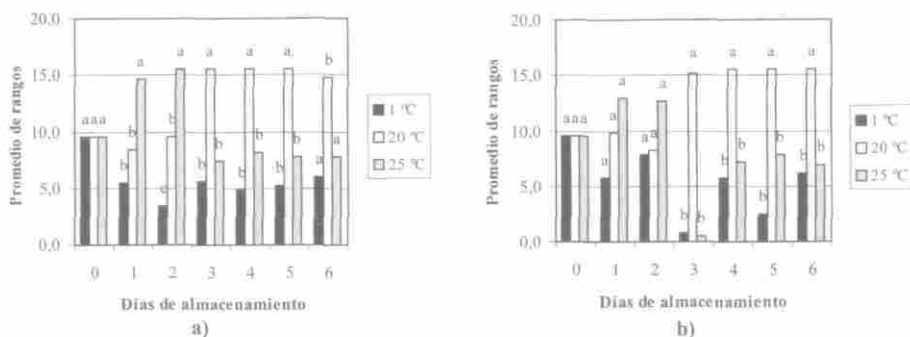


Figura 6. Comparación a) del color de la corteza y b) del color y apariencia de la pulpa de frutos frescos de *Pourouma cecropiifolia* almacenados a 1, 20 y 25 °C, HR 85% durante seis días. Letras diferentes, dentro de un mismo día, indican diferencia significativa, de acuerdo con Kruskal-Wallis.

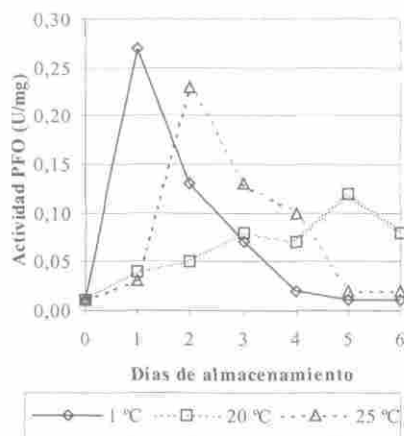


Figura 7. Actividad de polifenoloxidasas en frutos de *Pourouma cecropiifolia* almacenados a 1, 20 y 25 °C, HR 85% durante seis días.

POD en los frutos almacenados a estas temperaturas.

Actividad de polifenoloxidasas. En la figura 7 se aprecia que la actividad de PFO durante el almacenamiento del fruto a temperatura ambiente presenta un máximo a los dos días después de la cosecha, que coincide con el máximo en la intensidad respiratoria y con el máximo desarrollo en las características sensoriales del fruto, en donde la PFO debe estar en forma latente o, si está en forma activa, debe encontrarse en compartimentos, separada de los sustratos sobre los que actúa ya que, de acuerdo con el análisis sensorial, en este momento aún no hay pardeamiento.

En los frutos que maduran también de forma adecuada a 20 °C, se presenta un comportamiento similar. La actividad se incrementa hasta el día quinto, que coincide con el máximo climaterico y con los valores más altos en la evaluación del color de la corteza y de la pulpa y, en general, de la calidad total. A los cinco días de

almacenamiento a 20 °C, la actividad de PFO es inferior a la encontrada a los dos días de almacenamiento de los frutos a 25 °C. Parece que la disminución de la temperatura en 5 °C disminuye el metabolismo del fruto y prolonga su climaterio. Como el fruto ha tenido más tiempo para su desarrollo, el climaterio se da con menor intensidad.

Luego del climaterio, a 20 y a 25 °C, la actividad de PFO disminuye, probablemente a consecuencia de la lisis de las membranas celulares y su acción sobre sustratos fenólicos, causando pardeamiento, en donde los productos de la reacción la pueden estar inhibiendo. Resultados similares se han encontrado con PFO extraída de corteza de lulo, madurados a 18 °C (8). Por el contrario, en PFO extraída de banano hay una tendencia a la disminución durante la maduración del fruto (25).

En los frutos refrigerados a 1 °C, la actividad de PFO se hace máxima en el primer día. En este momento las lesiones ya son detectadas por el panel, por lo que el frío puede haber inducido la compartimentalización de los sustratos y de la enzima, provocando su reacción. La disminución de la actividad de PFO durante los siguientes días puede ser el resultado de la inactivación de la enzima por los productos de su reacción.

Actividad de peroxidasa. Al evaluar la actividad de POD (figura 8), se observa que en las frutas maduras a 25 °C la actividad, al igual que PFO, presenta un primer máximo a los dos días, el cual coincide con el máximo climaterico. A 20 °C el máximo en esta actividad se presenta a los cinco días, que coincide también con el

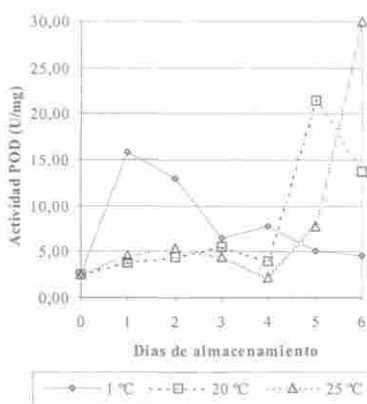


Figura 8. Actividad de peroxidasa en frutos de *Pourouma cecropiifolia* almacenados a 1, 20 y 25 °C, HR 85% durante seis días.

máximo climatérico. A partir del quinto día la actividad se incrementa, al sexto día su actividad es cinco veces mayor respecto a la del máximo climatérico. Este incremento súbito en la actividad puede estar relacionado con la contaminación microbológica del fruto, en el que se debe estar midiendo actividad de POD de origen bacteriano o fúngico.

A 1 °C la actividad de POD se hace máxima al primer día de almacenamiento. Esta actividad puede estar relacionada con una respuesta de la célula para contrarrestar la acumulación de sustancias que contienen oxígeno activo, como el H_2O_2 , generadas por el alto metabolismo oxidativo, en relación directa con las lesiones por frío (26, 27). Como consecuencia de la acción de esta enzima puede haber generación de sustancias coloreadas (7).

Debido a que en los máximos de PFO y POD las características sensoriales de los frutos son óptimas, es de sugerir que estas enzimas, dentro de la célula, deben estar compartimentalizadas o en forma inactiva y

que durante el proceso de extracción salen de sus compartimentos o son activadas (10, 13, 28). Es interesante observar que la actividad de POD es máxima durante el climatérico ya que el consumo del fruto en este estado puede contribuir en la disminución de sustancias que contienen oxígeno activo.

CONCLUSIONES

Se evaluaron las condiciones óptimas de medida de la actividad de Peroxidasa y Polifenoloxidasas extraídas de uva caimaron (*Pourouma cecropiifolia*). El valor de K_M y V_{max} con L-Dopa para polifenoloxidasas es 2,70 mM y 0,27 U/mg, respectivamente. Ésta alcanza la máxima actividad a pH 7,0 y a 37 °C. Para peroxidasa, al usar guayacol como donador de protones, los valores de K_M y V_{max} son de 10,0 mM y 6,67 U/mg y al emplear H_2O_2 como sustrato, los valores son 0,17 mM y 7,14 U/mg, respectivamente. Esta enzima se inactiva a concentraciones mayores de 10 mM de H_2O_2 , tiene un pH óptimo de 6,0, temperatura óptima de 37 °C y es más termorresistente que la polifenoloxidasas.

La refrigeración del fruto de uva caimaron a 1 °C genera lesiones por frío, caracterizadas por pardeamiento de la corteza y de la pulpa. La refrigeración a 20 °C prolonga la vida útil del fruto en por lo menos tres días, si se compara con los almacenados a temperatura ambiente (25 °C).

En los frutos refrigerados a 1 °C, la actividad de la PFO y de la POD se hace máxima luego de 24 horas de iniciado el tratamiento; esta actividad se encuentra en relación directa con el pardeamiento que manifiestan los frutos.

A 25 °C la actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa se hace máxima luego de dos días de almacenamiento, momento que coincide con la madurez sensorial de los frutos; al final, la actividad de peroxidasa y la respiración se incrementan indicando que el fruto está próximo a morir. El comportamiento a 20 °C es similar al observado a 25 °C, con un desplazamiento en el máximo de actividad enzimática de tres días. Al disminuir la temperatura ambiente en 5 °C, disminuye el metabolismo del fruto en tres días.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta M. M. R.; Velásquez B. M. A. Caracterización de uva caimaron (*Pourouma cecropiifolia*). Trabajo de grado. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1998.
2. Restrepo, S. L. P. (2000). Inhibición de los daños por frío en frutas tropicales. En Segundo Congreso Iberoamericano de Tecnología Poscosecha y Agroexportaciones. Tercer simposio: Control de fisiopatías en frutas durante el almacenamiento en frío. Luchsing, L.; Villamizar, C. F.; Báez, S. R. (Ed.), pp. 39-45.
3. Madani, W.; Kermasha, S.; Bisakowski, B. (1999). Inhibition of Tyrosinase Activity by a Polyphenol esterase using selected phenolic substrates. *Phytochem.* 52, pp. 1001-1008.
4. Sakiroglu, H.; Kúfrevioglu, Ö. I.; Kocacaliskan, I.; Oktay, M.; Onganer, Y. (1996). Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Reicht.) Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 44, pp. 2982-2986.
5. Zhou, H.; Feng, X. 1991. Polyphenol Oxidase from Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*). *J. Sci. Food. Agric.* 37, pp. 307 - 313
6. Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. (1989). Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). *J. Food. Sci.*, 54 (3), pp. 644-649.
7. Richard-Forget, F. C.; Gaillard, F. A. (1997). Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. *J. Agric. Food Chem.* 45, pp. 2472-2476.
8. Rubio, M. E. Estudio del cambio de actividad de polifenoloxidasas, PFO, durante el proceso de maduración del lulo (*Solanum quitoense* L.). Trabajo de grado. M. Sc. en Química. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1999.
9. Martínez, P.; Restrepo, L. P. Estudio de la actividad de la polifenoloxidasas en hojas de Café Caturra y efecto del Cu^{2+} sobre ésta. Trabajo de grado. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1981.
10. Escribano, J.; Cabanes, J.; García-Carmona, F. (1997). Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in

- Table Beet: Effect of Sodium Dodecyl Sulphate. *J. Sci. Food Agric.* 73, pp. 34-38.
11. Mayer, A. M.; Harel, E. (1979). Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochem.* 18, pp. 193-215.
 12. Valero, E.; Varón, R.; García-Carmona, F. (1992). Kinetic Study of the Effect of Metabisulfite on Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 40, pp. 904-908.
 13. Grison, R.; Pilet, P-E. (1985). Cytoplasmatic and Wall Isoperoxidases in Growing Maize Roots. *J. Plant Physiol.* 118, pp. 189-199.
 14. Takahama, U.; Egashira, T. (1991). Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochem.* 30, pp. 73-77.
 15. Lee, T-M.; Lin, Y-H. (1996). Peroxidase activity in relation to ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile elongation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 37, pp. 239-245.
 16. Martínez-Parra, J.; Muñoz, R. (2001). Characterization of Betacyanin Oxidation Catalyzed by a Peroxidase from *Beta vulgaris* L. Roots. *J. Agric. Food Chem.* 49, pp. 4064-4068.
 17. Hirota, S.; Shimoda, T.; Takahama, U. (1998). Tissue and Spatial Distribution of Flavonol and Peroxidase in Onion Bulbs and Stability of Flavonol Glucosides during Boiling of the Scales. *J. Agric. Food Chem.* 46, pp. 3497-3502.
 18. Pütter, J. (1974). *Peroxidases*. In Ulrich, B. H. (Ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press Inc.: New York, pp. 685-690.
 19. Bolaños, R. C. Conservación y transformación del fruto de maracó (*Theobroma bicolor* HBK). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1997.
 20. López, C. O.; Restrepo, P.S.; Mahecha, G.L. (1998). Evaluación Sensorial de Alimentos. Guías de Laboratorio, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, pp. 7-22.
 21. Cano, M. P.; Lobo, M. G.; de Ancos, B.; Galeazzi, M. A. M. (1996). Polyphenol Oxidase from Spanish Hermaphrodite and Female Papaya Fruits (*Carica papaya* Cv. Sunrise, Solo Group). *J. Sci. Food Agric.* 44, pp. 3075-3079.
 22. Das, J. R.; Bhat, S. G.; Gowda, L. R. (1997). Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Kew cultivar of Indian Pineapple Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, pp. 2031-2035.
 23. Fujita, S.; bin Saari, N.; Maegawa, M.; Tetsuka, T.; Hayashi, N.; Tono, T. (1995). Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 43, pp. 1138-1142.
 24. Zhou, P.; Smith, N. L.; Lee, C. Y. (1993). Potential Purification and Some Properties of Monroe Apple Peel Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 41, pp. 532-536.

25. Cano, P.; Marín, M. A.; Fuster, C. (1990). Effects of Some Thermal Treatments on Polyphenoloxidase and Peroxidase Activities of Banana (*Musa cavendishii*, var enana). *J. Sci. Food Agric.* 51, pp. 223-231.
26. Prasad, T. K. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: change in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10 (6), pp. 1017-1026.
27. Sala, J. M.; Lafuente, M. T. (1999). Catalase in the Heat-Induced Chilling Tolerance of Cold-Stored Hybrid Fortune Mandarin Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, pp. 2410-2414.
28. Robinson, S. P.; Dry, I. B. (1992). Broad Bean Leaf Polyphenol Oxidase is a 60-Kilodalton Protein Susceptible to Proteolytic Cleavage. *Plant Physiol.* 99, pp. 317-323.