

PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO DE LA PULPA CONGELADA DE UVA CAIMARONA (*Pourouma cecropiifolia*)

¹Ángela Patricia Rivera Camero

²Patricia Restrepo

^{2,3}Carlos Eduardo Narváez Cuenca

RESUMEN

Las enzimas polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD) fueron extraídas de la pulpa de uva caimaronas (*Pourouma cecropiifolia*) y caracterizadas parcialmente. Para PFO se encontró un pH óptimo de 7,0, temperatura óptima de 45 °C y K_M de 0,42 mM con L-Dopa como sustrato. Para POD se halló un pH óptimo de 6,0, temperatura óptima de 37 °C y valores de K_M de 1,97 mM para guayacol y 0,72 mM para H_2O_2 . El perfil electroforético mostró cinco iso-PFO y tres iso-POD. POD fue más termoresistente que PFO. De cuatro inhibidores estudiados el ácido ascórbico fue el inhibidor más potente, seguido por el bisulfito de sodio, mientras que el ácido cítrico y el cloruro de sodio fueron los menos potentes. El escaldado fue el tratamiento más efectivo en el control del pardeamiento de la pulpa, seguido por la adición de bisulfito de sodio, en tanto que el ácido cítrico y el ascórbico generaron coloraciones rosadas. Además de la inactivación de la polifenoloxidasas y la peroxidasa, la adición de ácidos y de sustancias blanqueadoras a la pulpa de uva caimaronas, juegan un papel importante en los cambios de coloración durante su congelación.

Palabras clave: Polifenoloxidasas, Peroxidasa, *Pourouma cecropiifolia*, pardeamiento, color, aditivos, frutas amazónicas, uva caimaronas

INTRODUCCIÓN

Es importante aclarar que aunque *Pourouma cecropiifolia* es conocida como uva caimaronas en la Región Amazónica colombiana esta fruta es diferente de la especie *Vitis*. Esta fruta, considerada como promisorias de la Región Amazónica, se distingue no sólo por ser una buena fuente de potasio, calcio, magnesio y fósforo sino también por su color y flavor (1). La uva caimaronas sólo es comercializada en la Región Amazónica y sitios aledaños debido a que es altamente perecedera: cuando se almacena a 20 y 25 °C presenta un tiempo de vida útil de 5 y 2 días respectivamente y por debajo de 15 °C presenta lesiones por frío (2). Su principal factor de daño es el pardeamiento de su pulpa (2) por lo que, si se desea mejorar su comercialización se debe trabajar en técnicas que prolonguen su vida útil. La congelación tiene un potencial interesante en la prevención del deterioro de la pulpa de uva caimaronas.

Diversas investigaciones han relacionado la actividad de la fracción citoplasmática (soluble) de polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1, PFO) y peroxidasa (EC 1.11.1.7, POD) con el deterioro del color, flavor, textura y valor nutricional de vegetales frescos y procesados, ya que justamente esta fracción es la que entra más fácilmente en contacto con los sustratos propios de las células (3-12). Se sabe que PFO y POD extraídas de diferentes tejidos vegetales pueden ser inactivadas por tratamientos

¹Docente Universidad de la Amazonia, Florencia-Caqueta

²Docente Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

³cenarvaezc@unal.edu.co

térmicos (4, 13, 14) y por ciertos compuestos químicos usados en la industria de los alimentos como cloruro de sodio, sulfitos, ácido ascórbico, sacarosa, EDTA y ácido benzoico (4, 7, 10, 11, 14, 15). La prevención del pardeamiento de la pulpa de uva caimaroná por adición de sulfitos, cloruro de sodio, ácido ascórbico y ácido cítrico, con y sin escaldado previo al almacenamiento a 20 °C ha sido investigada con resultados poco alentadores sin embargo, el tiempo de vida útil se ha prolongado a 14 días cuando se han aplicado algunos de estos tratamientos previo a la congelación (16). Es necesario caracterizar la PFO y la POD solubles extraídas de la pulpa de uva caimaroná para fortalecer la aplicación de métodos adecuados, permitidos en la industria de los alimentos que generen productos con buena aceptación, para controlar el pardeamiento de la pulpa de uva caimaroná. Además, no se conoce si los efectos de diversos tratamientos sobre el color de la pulpa congelada están relacionados con la inhibición de PFO y POD. Este trabajo se planteó con el objeto de caracterizar parcialmente PFO y POD solubles y de establecer una posible relación entre las actividades enzimáticas y el color de la pulpa congelada de uva caimaroná.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutas de uva caimaroná. Las frutas estudiadas fueron cosechadas en su madurez sensorial (100% color morado en corteza). Éstas se obtuvieron de un cultivo tecnificado, en Corpoica – Macagual, ubicado a 20 km de Florencia – Caquetá (25 °C, 85% HR), en la Amazonia colombiana. Se seleccionaron las frutas sanas, libres de infección y se despulparon manualmente.

Obtención del extracto enzimático. La pulpa fue congelada con aire líquido y homogenizada con acetona a – 20 °C durante 20 s en relación 1 a 5 (w/v). El polvo de acetona resultante fue filtrado al vacío y lavado con acetona fría hasta lograr un filtrado incoloro. Los polvos de acetona fueron agitados durante 24 h con buffer fosfatos 100 mM, pH 7,0 (relación pulpa : extractante, 1:1, w/v). La suspensión resultante fue centrifugada a 12000 x g durante 10 min. El sobrenadante fue usado para determinar las actividades de PFO y POD solubles. Durante todo el proceso de extracción la temperatura no subió de 4 °C.

Determinación de proteína. La proteína se cuantificó de acuerdo al método de Bradford (17) linealizado por Zor y Selinger (18) con albúmina sérica bovina como estándar.

Actividad enzimática. Para medir la actividad de PFO se adicionaron 100 mL de extracto enzimático sobre 900 µL de L-Dopa 7,0 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 7,0 y lectura del cambio de absorbancia respecto al tiempo a 475 nm (19) a 45 °C. Para evaluar la actividad de POD se mezclaron 25 µL de extracto enzimático, previamente diluido 1 a 20, con 975 µL de una mezcla de guayacol 40 mM y H₂O₂ 5,0 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 6,0 y lectura del cambio de absorbancia respecto al tiempo a 470 nm a 37 °C (13).

Las unidades de PFO y POD (UPFO, UPOD) fueron definidas como el incremento en una unidad de absorbancia por minuto (2). Las actividades específicas se expresaron como unidades enzimáticas por mg de proteína (UPFO/mg proteína y UPOD/mg proteína).

Caracterización cinética.

Efecto del pH y de la temperatura. Se evaluó la actividad enzimática a valores de pH entre 4,0 y 5,5 usando buffer citratos 200 mM y entre 6,0 y 8,0 empleando buffer fosfatos 200 mM. Para PFO se empleó L-Dopa 7,0 mM y medida de la actividad a 45 °C. Para POD se empleó una mezcla de donador de protones/sustrato: guayacol/ H₂O₂, 40 mM/5,0 mM y medida de la actividad a 37 °C. Para evaluar el efecto de la temperatura los ensayos se efectuaron variando la temperatura de entre 20 a 70 °C. La

estabilidad térmica de ambas enzimas fue evaluada por incubación de los extractos proteicos a temperaturas entre 37 a 98 °C durante 10 min. Al finalizar este tiempo los extractos fueron enfriados en un baño de hielo y se evaluó la actividad enzimática.

Determinación de K_M . Para determinar el valor de K_M para PFO se ensayaron concentraciones de L-Dopa comprendidas entre 0,1 y 10,0 mM a pH y temperatura óptimos. Para POD se evaluó el valor de K_M a a pH y temperatura óptimos para el donador de protones (guayacol) y el sustrato (H_2O_2): se ensayaron concentraciones de guayacol entre 0,25 y 40 mM a 5,0 mM de H_2O_2 y concentraciones de H_2O_2 entre 0,025 y 20,0 mM a 40 mM de guayacol.

Perfil electroforético. Se desarrollaron electroforesis en condiciones nativas con geles de poliacrilamida (10%) en un equipo Biorad miniprotean two cell unit, 200 V por 45 min con buffer de corrida Tris-glicina pH 8,3 a 4 °C. Para la detección de las iso-PFO el gel fue sumergido en buffer fosfatos 200 mM pH 7,0 con L-Dopa 7 mM e incubación a 45 °C durante 20 min, las bandas aparecieron con coloración oscura. Para la detección de las iso-POD, los geles fueron sumergidos en buffer fosfatos 200 mM pH 6,0 con guayacol 40 mM y H_2O_2 5,0 mM durante 20 min a 37 °C, las bandas aparecieron teñidas de color rosado intenso. El teñido de las bandas fue detenido por lavado con agua fría.

Inhibidores. Se evaluó el efecto del cloruro de sodio, ácido cítrico, ácido ascórbico y bisulfito de sodio, en tres dosis, sobre la actividad enzimática. Se procedió igual que en la evaluación de la actividad enzimática, excepto la presencia del aditivo: se adicionaron 100 μ L del aditivo de concentraciones iniciales 1,0; 10,0 y 100,0 mM para proporcionar en la mezcla de reacción concentraciones de 0,1; 1,0 y 10,0 mM de cada uno de los inhibidores, por lo que se incorporaron 100 μ L menos de buffer.

Evaluación del pardeamiento de la pulpa durante su congelación.

Procesamiento. Las frutas fueron despulpadas manualmente. Se aplicaron diferentes tratamientos a 100 g de pulpa: control, escaldado en agua hirviendo (98 °C) durante 10 min. Los otros tratamientos consistieron en la adición de los mismos inhibidores usados en los ensayos enzimáticos. Cada aditivo fue empleado en la dosis usada comúnmente en la industria de alimentos para la conservación de pulpas: ácido ascórbico 0,05%; cloruro de sodio 0,5%, ácido cítrico 0,5%, bisulfito de sodio 0,02% (16). La pulpa fue empacada en bolsas de polietileno e inmediatamente fue congelada a - 8 °C (temperatura típica para la congelación de pulpas) durante 60 días.

Evaluación del color. La evolución del color de la pulpa congelada fue determinada a través del método descriptivo y un panel entrenado de 11 miembros. La evaluación se efectuó luego de 1, 30 y 60 días. La escala empleada fue: 0(-) Color típico de la pulpa, no hay pardeamiento; 1(+) Pardeamiento leve; 2(++) Pardeamiento moderado; 3(+++) Pardeamiento intenso; 4(++++) Pardeamiento severo.

Análisis estadístico. La caracterización cinética y los ensayos con inhibidores se efectuaron por triplicado. Sobre estos resultados se calcularon los promedios, desviaciones estándar, se realizó el ANOVA de acuerdo al modelo escogido y se compararon las diferencias entre tratamientos por la prueba de Tukey. Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento congelado se empleó la prueba de Friedman, la diferencia entre tratamientos fue comparada por la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Caracterización cinética. Debido a que los valores de pH óptimo, T óptima y K_M dependen del tipo de sustrato empleado las comparaciones con otros reportes serán con L-Dopa para PFO y con guayacol/ H_2O_2 para POD. La figura 1a muestra que la actividad de PFO y POD es máxima a valores de pH de 7,0 y 6,0, respectivamente. Estos valores coinciden con los encontrados en un trabajo previo para PFO-total y POD-total extraídas del conjunto pulpa más corteza de uva caimaroná (2) y similares a los encontrados para POD-soluble de repollo (*Brassica oleracea*): 6,4 (7) y tres isoPOD-total de arveja (*Pisum sativum*): 5,0, 6,0 y 5,0 (13). El valor de 8,0 para PFO-soluble de dog rose (*Rosa dumalis*) (10) difiere del encontrado en este trabajo para uva caimaroná.

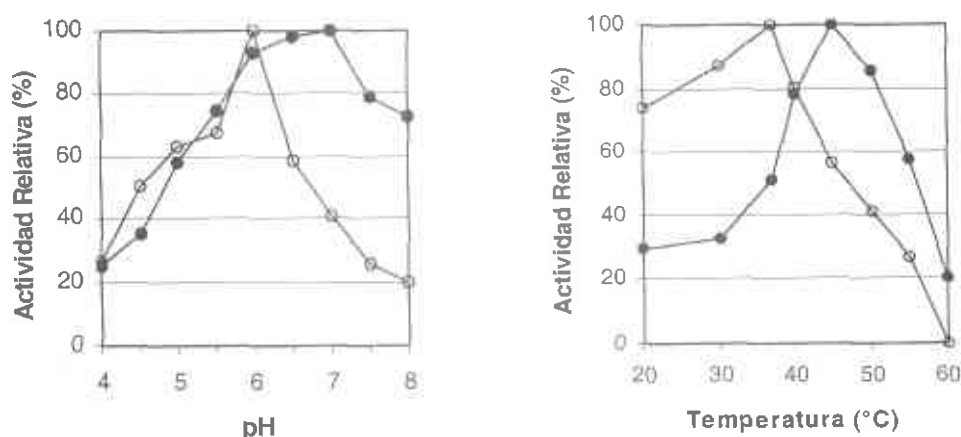


Figura 1. Efecto del a) pH y de la b) temperatura sobre la actividad de polifenoloxidasas (?) y peroxidasa (o)

En la figura 1b se representa el efecto de la temperatura sobre la actividad de PFO y POD. La temperatura que genera la máxima actividad de PFO es 45 °C y de POD es 37 °C; a partir de 60 °C la actividad de POD no fue detectable mientras que la de PFO representó un 20% de la máxima actividad. El valor de temperatura óptima para PFO es igual al reportado para PFO-soluble de frutos de dog rose (10). Los valores encontrados en nuestro estudio son diferentes a los reportados para PFO-total y POD-total de uva caimaroná, en el que la actividad de ambas enzimas es óptima entre 30 a 40 °C y detectable para POD incluso a 80 °C (2) y para POD-soluble extraída de repollo, 45 °C (7).

Tras la evaluación de la estabilidad térmica de PFO y POD (Figura 2) se encontró que POD es más termoresistente que PFO. La actividad de PFO desciende a 60% al calentar el extracto a 60 °C durante 10 min, mientras que para lograr este mismo efecto sobre POD el extracto se debe calentar a temperaturas superiores de 70 °C. Por encima de 80 °C la actividad de estas dos enzimas cae por debajo de 5%, lo cual hace pensar que tratamientos térmicos a 80 °C o mayores durante 10 min sean adecuados para controlar el pardeamiento de la pulpa. Sin embargo, se debe tener cuidado con posibles fenómenos de reactivación, no estudiados aquí, que pueden presentar estas enzimas luego del calentamiento como aparece reportado en POD extraída de arveja (13) y en PFO de frutos de dog-rose (10). Aunque la POD y la PFO están relacionadas con el pardeamiento de vegetales, la mayor termoresistencia y mayor actividad de la POD (Tabla 1) puede indicar que esta enzima tiene un papel más importante que la PFO en el pardeamiento de la pulpa de uva caimaroná.

Los valores de actividad enzimática en función de la concentración fueron analizados de acuerdo al modelo de Lineweaver-Burk y se calcularon los valores aparentes de K_M y $V_{Máx}$ (Tabla 1). Para PFO

se encontró un valor de K_M de 0,42 mM, valor que indica mayor afinidad por L-Dopa al reportado para PFO-total extraída de uva caimaroná ($K_M = 2,70$ mM) (2) y a los encontrados para PFO-soluble de pera (*Pyrus bretschneideri*) ($K_M = 8,9$ mM) (4) y de dog rose ($K_M = 0,606$ mM) (10). Al evaluar el efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de POD se encontró un valor de K_M de 1,97 mM. Esta enzima presenta mayor afinidad por este tipo de donador de protones que POD-total extraídas del fruto entero sin semilla de uva caimaroná ($K_M = 10,0$ mM) (2) y de arveja verde ($K_M = 10,2; 10,2$ y $10,8$ mM, para tres isoenzimas) (13). Al evaluar el efecto de la concentración del H_2O_2 sobre la actividad de POD se encontró que a partir de 10 mM la actividad de inhibe. El efecto inhibitorio de H_2O_2 ha sido descrito en otros trabajos (2, 13). El valor de K_M para H_2O_2 de 0,72 mM muestra menor afinidad que la POD-total extraída de uva caimaroná (pulpa más corteza) ($K_M = 0,17$ mM) (2) pero mayor afinidad que para las isoPOD-total extraídas de arveja verde ($K_M = 2,6; 7,2$ y $4,3$ mM) (13).

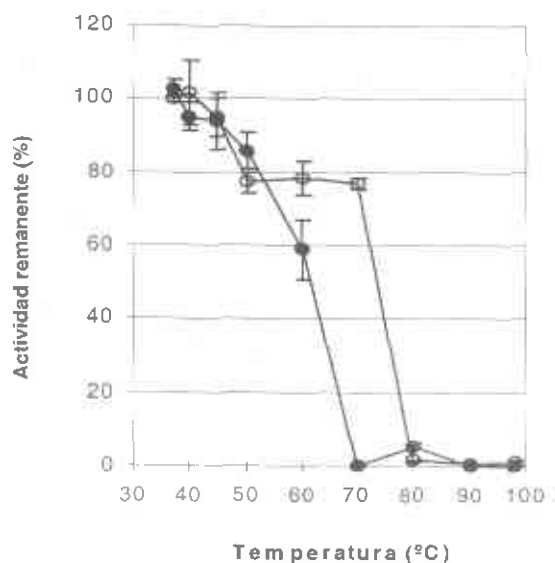


Figura 2. Inactivación térmica de polifenoloxidasas (●) y peroxidasa (○) extraídas de *Pourouma cecropiifolia*. Los resultados son el promedio de tres determinaciones \pm SD

Tabla 1. Valores de K_M y $V_{M\acute{a}x}$ de polifenoloxidasas y peroxidasa extraídas de *Pourouma cecropiifolia*

	PPO L-DOPA	POD guayacol	POD H_2O_2
K_M (mM)	0,42	1,97	0,72
$V_{M\acute{a}x}$ (U/mg proteína)	2,27	170	170

Perfil electroforético. Una vez corridas las electroforesis aparecieron 5 bandas con actividad de PFO con movilidades electroforéticas de 0,38; 0,46; 0,51; 0,57 y 0,72 y tres bandas con actividad de POD con movilidades electroforéticas de 0,40, 0,45 y 0,63. La existencia de diverso número de iso-PFO e iso-POD ha sido reportada en otros tejidos. Así por ejemplo para PFO se han encontrado entre 1 a 6 isoenzimas (3, 7, 10, 11, 20, 21) y para POD entre 1 a 11 (5, 7, 9, 13, 21, 22).

Inhibidores. En la tabla 2 se muestra el efecto del ácido ascórbico, ácido cítrico, bisulfito de sodio y cloruro de sodio, en tres dosis cada uno, sobre la actividad de POD y PFO. Al emplear ácido ascórbico se encontró que la PFO fue inactivada totalmente incluso a la concentración más baja ensayada, mientras que la POD sufrió menos inactivación; una solución 0,1 mM de este ácido inhibió en 64% la actividad de POD. Este ácido fue el inhibidor más potente de los evaluados, para ambas enzimas. La acción de este compuesto sobre el pardeamiento enzimático se debe a que reduce las quinonas, formadas por la enzima, al difenol original antes de que éstas sufran reacciones secundarias para

generar compuestos pardos (23). Para PFO y POD solubles extraídas de repollo el ácido ascórbico se reporta como el inhibidor más potente dentro de los estudiados (7). Préstamo y Manzano (9) han determinado que el ácido ascórbico en concentraciones entre 2 a 170 μM inhibe completamente la POD de papa (*Solanum tuberosum* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang and A.R. Ferguson], coliflor [*Bassica oleracea* (Botrytis group)], arveja (*Phaseolus vulgaris* L.) y rábano (*Armoracia rusticana* Gaertn, Mey Scherb.).

Una concentración de 0,1 mM de ácido cítrico se mostró con un efecto activante de POD, mientras que a esta misma concentración la actividad de PFO no se vio afectada respecto al testigo. El efecto activante observado para POD no fue significativamente diferente del control. Al incrementar la concentración del ácido cítrico, la pérdida de actividad aumentó. Debido a que las enzimas en estudio requieren de la presencia de metales para su actividad (son metaloenzimas: PFO contiene cobre y POD contiene hierro), el ión citrato puede actuar como secuestrante formando complejos estables con estos cationes, disminuyendo por lo tanto la actividad de estas enzimas.

Al emplear bisulfito de sodio la inhibición fue significativamente mayor para PFO que para POD, lográndose una inactivación total de PFO a una concentración 10,0 mM de bisulfito, mientras que a esta misma concentración la inhibición para POD fue de 47%. También se observa, para ambas enzimas, que al incrementar la concentración se aumentó la inhibición. Este tipo de compuestos controla el pardeamiento enzimático debido a reacciones de adición de éstos sobre las quinonas, generando productos incoloros estables, por reacciones de reducción de las quinonas a los fenoles iniciales (24) o por enlace al sitio activo de la enzima (25, 26). Si bien, algunos autores indican que el bisulfito de sodio es un inhibidor potente de PFO (4, 25, 26) y que la inhibición de esta enzima por

Tabla 2. Efecto de cuatro inhibidores en la actividad de PFO y POD

Tratamiento (mM)	Actividad remanente (%)	
	PFO	POD
Control	100,0 \pm 6,4 a (a)	100,0 \pm 9,9 a (a)
Acido ascórbico		
0,1	0,0 \pm 0,0 e (b)	33,8 \pm 1,5 e (a)
1,0	0,0 \pm 0,0 e (a)	0,0 \pm 0,0 f (a)
10,0	0,0 \pm 0,0 e (a)	0,0 \pm 0,0 f (a)
Acido cítrico		
0,1	98,6 \pm 5,6 a (a)	107,3 \pm 6,2 a (a)
1,0	89,5 \pm 0,9 b (a)	89,3 \pm 2,6 b (a)
10,0	70,8 \pm 4,3 c (a)	73,6 \pm 3,6 c (a)
Bisulfito de sodio		
0,1	73,4 \pm 4,6 c (a)	70,8 \pm 0,9 c (a)
1,0	7,9 \pm 1,6 d (b)	65,3 \pm 12,0 cd (a)
10,0	0,0 \pm 0,0 e (b)	52,6 \pm 8,0 d (a)
Cloruro de sodio		
0,1	92,4 \pm 5,6 a (a)	99,0 \pm 14,6 a (a)
1,0	94,9 \pm 2,7 a (a)	74,0 \pm 3,6 c (b)
10,0	74,2 \pm 1,4 c (a)	70,0 \pm 2,6 c (a)

Los resultados son el promedio de tres determinaciones \pm SD. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Letras diferentes en paréntesis en la misma fila indican diferencias significativas (Prueba de Tukey)

efecto del ácido ascórbico no es del todo clara (27), para PFO-soluble extraída de piña se reporta que el ácido ascórbico es mejor inhibidor que el bisulfito, ambos a la misma concentración (11). Adicionalmente, el efecto inhibitorio de los sulfitos es dependiente del tiempo de incubación (26).

Al incrementar la concentración del cloruro de sodio el poder inhibidor tendió a incrementarse. El efecto sobre las enzimas en estudio fue inferior al mostrado por el ácido ascórbico y por el bisulfito de sodio y similar al del ácido cítrico. El cloruro de sodio se reporta, dentro de 13 inhibidores estudiados, como un inhibidor pobre de la actividad de PFO y POD extraídas de repollo (7). Sin embargo, este mismo compuesto aparece como promotor de la actividad enzimática de PFO extraída de pera (4) y de frutos de dog-rose (10). El efecto inhibidor de esta sal puede surgir como resultado de la unión de los iones cloruro a formas protonadas de la enzima, a enzima libre o al complejo enzima-sustrato, generando un cambio conformacional (28).

Evaluación del pardeamiento de la pulpa durante su congelación. En la tabla 3 se aprecia que la pulpa congelada sin tratamiento previo (control) se pardea rápidamente. El tratamiento con ácido ascórbico muestra un efecto similar al de la pulpa control al primer día de almacenamiento congelado. Al finalizar el almacenamiento estas pulpas tienen un pardeamiento entre intenso y severo. El incremento del pardeamiento de la pulpa con ácido ascórbico puede estar en relación con la destrucción de esta vitamina durante la congelación, aunque esta pérdida suele ser baja (29).

El uso de ácido cítrico y de cloruro de sodio generó, luego de un día de congelación, un pardeamiento severo, mostrando diferencias significativas con el control. Para la pulpa tratada con ácido cítrico y ascórbico los panelistas reportaron coloraciones rosadas atípicas, más intensas con el cítrico. Debido a que esta fruta contiene altos niveles de flavonoides (1) es posible que la inclusión de sustancias ácidas disminuyan el pH original de la pulpa generando una transformación estructural en este tipo de componentes de tal manera que estas nuevas moléculas pueden tener coloraciones entre naranja, rojo y azul o sean más sensibles a la oxidación (30). Al emplear cloruro de sodio no se aprecia una relación clara entre su efecto inhibidor tanto para POD como para PFO y el promotor de pardeamiento en la pulpa.

El tratamiento de escaldado y la adición de bisulfito de sodio, luego del primer día de congelación, mantuvieron el color típico de la pulpa de uva caimaroná. Luego de 60 días la pulpa escaldada conservó su color original; con bisulfito, luego de este mismo periodo de tiempo, el pardeamiento fue

Tabla 3. Resultados de la evaluación sensorial del color de la pulpa de uva caimaroná durante su almacenamiento a -8°C

Tratamiento	Días de congelación a -8°C		
	1	30	60
Control	++ c (b)	++++ a (a)	+++ c (a)
Escaldado $98^{\circ}\text{C}/10$ min	- d (a)	+ d (a)	- f (a)
Acido ascórbico 0,05%	++ c (c)	++++ b (b)	++++ a (a)
Acido cítrico 0,5%	+++ b (a)	++ c (ab)	++ d (b)
Bisulfito de sodio 0,02%	- d (c)	+ d (b)	++ e (a)
Cloruro de sodio 0,5%	+++ a (b)	++++ a (ab)	+++ b (a)

- Color característico de la pulpa de uva caimaroná, no hay pardeamiento + Pardeamiento leve
 ++ Pardeamiento moderado. +++ Pardeamiento intenso. ++++ Pardeamiento severo Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a Kruskal-Wallis. Letras diferentes en paréntesis en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo a Friedman

moderado. El efecto del escaldado en el color de la pulpa congelada estuvo en relación con la inactivación térmica de la PFO y de la POD, ambos tratamientos a 98 °C durante 10 min. Aquí es importante considerar que estas enzimas también pueden ser desnaturalizadas e inactivadas por efecto de la congelación del tejido que las contiene (6). Los resultados obtenidos con la aplicación del escaldado son mejores que los reportados por otros autores (16). Por otro lado, es importante tener presente que el uso del bisulfito en el control del pardeamiento tiene problemas relacionados con la pérdida de aroma, sabor residual amargo (16), destrucción de vitamina B1 y reacciones de sensibilización (31), por lo que su uso es restringido. Aunque el escaldado en agua hirviendo durante 10 min previo a la congelación fue el mejor tratamiento para la conservación del color de la pulpa, es importante considerar que este tratamiento puede tener efectos negativos en el flavor, firmeza y apariencia general de la pulpa procesada.

CONCLUSIONES

La caracterización cinética parcial de PFO-soluble y POD-soluble extraídas de la pulpa de la uva caimaroná indica que estas enzimas están relacionadas con el pardeamiento de la pulpa. Aunque el ácido ascórbico fue el inhibidor de PFO y POD más efectivo, su efecto en el color de la pulpa durante el almacenamiento congelado fue menor que el mostrado por el bisulfito de sodio. Es posible que el ácido ascórbico disminuya el pH de la pulpa cambiando sus flavonoides. Por otra parte, el bisulfito de sodio puede reaccionar con los pigmentos de la pulpa produciendo compuestos sulfónicos incoloros. La inactivación térmica de PFO y POD a 98 °C estuvo relacionada con el color de la pulpa escaldada previo a la congelación. De acuerdo a nuestro estudio, el escaldado de la pulpa de uva caimaroná en agua hirviendo durante 10 min previo a la congelación es el mejor tratamiento para su conservación. Este tratamiento permite prolongar la vida útil de la fruta de dos días, cuando es comercializada como fruto entero a 2 meses. La congelación de la pulpa de uva caimaroná es una alternativa viable para incrementar las posibilidades de mercadeo de esta fruta, sin embargo se requiere evaluar la calidad sensorial, química y bioquímica de la pulpa congelada en períodos superiores a 2 meses. Actualmente se está trabajando en el desarrollo de este objetivo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CAMARGO, C. H.; ACOSTA, M. M. R.; VELÁSQUEZ, B. M. A. 1991. Caracterización de la Uva Caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*). *Colombia Amazónica*. 5(2) 9-26
- (2) NARVÁEZ, C. C. E.; RESTREPO, P. 2002. Efecto del Almacenamiento de la Uva Caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*) a Diferentes Temperaturas sobre la Actividad de Polifenoloxidasas y Peroxidasas. *Rev. Col. Quím.* 31(2) 131-44
- (3) FUJITA, S.; TONO, T.; KAWAHARA, H. 1991. Purification and Properties of Polyphenol Oxidase in Head Lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sci. Food. Agric.* 33 643-51
- (4) ZHOU, H.; FENG, X. 1991. Polyphenol Oxidase from Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*). *J. Sci. Food. Agric.* 57 307-13
- (5) MARIN, M. A.; CANO, M. P. 1992. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. *J. Food Sci.* 57(3) 690-92, 734
- (6) FUSTER, C.; PRÉSTAMO, G.; CANO, M. P. 1994. Drip Loss, Peroxidase and Sensory Changes in Kiwi Fruit Slices During Frozen Storage. *J. Sci. Food Agric.* 64 23-29
- (7) 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 1138-42
- (8) BILLAUD, C.; LECORNU, D.; NICOLAS, J. 1996. Substrates and Carboxylic Acid Inhibitors of a Partially Purified Polyphenol Oxidase from Gum Arabic. *J. Agric. Food Chem.* 44 1668-75
- (9) PRÉSTAMO, G.; MANZANO, P. 1993. Peroxidases of Selected Fruits and Vegetables and the Possible use of Ascorbic Acid as an Antioxidant. *HortScience*. 28(1) 48-50

- (10) SAKIROGLU, H.; KÚFREVIOLU, Ö. I.; KOCACALISKAN, I.; OKTAY, M.; ONGANER, Y. 1996. Purification and Characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Recht.) Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **44** 2982-86
- (11) 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** 2031-35
- (12) 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** 34-38
- (13) 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) 644-9
- (14) RAYMOND, J.; RAKARIYATHAM, N.; ARANZA, L. (1993). Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase from Sunflowers Seeds. *Phytochemistry* **34** 927-31
- (15) NAGAI, T.; SUZUKI, N. 2003. Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max* L.) *J. Food Sci.* **68**(1) 16-20
- (16) Camargo, C.H.; Acosta, M. M. R.; Velásquez, B. M. A. 1991b. Conservación de la Pulpa de la uva Caimarona (*Pourouma cecropiifolia*). *Colombia Amazónica* **5**(2) 27-38
- (17) BRADFORD, M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.* **72** 248-54
- (18) Zor, T.; Selinger, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236** 302-08
- (19) SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F. 1995. Tyrosinase: a Comprehensive Review of its Mechanism. *Biochem. Biophys. Acta.* **1247** 1-11
- (20) TAKEO, T.; BAKER, J. E. 1972. Changes in Multiple forms of Polyphenol Oxidase During Maturation of tea leaves. *Phytochemistry* **12** 21-4
- (21) CANO, P.; MARÍN, M. A.; FÚSTER, C. 1990. Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana (*Musa cavendishii*, var enana). *J. Sci. Food Agric.* **51** 223-31
- (22) GRISON, R.; PILET, P-M. 1985. Cytoplasmatic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *J. Plant Physiol* **118** 189-99
- (23) Matheis, G.; Whitaker, J. R. (1984). Modification of protein by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food Biochem.* **8** 137-62
- (24) JANOVITZ-KLAPP, A. H.; RICHARD, F. C.; GOUPY, P.M.; NICOLAS, J. J. (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **38** 1437-41
- (25) VALERO, E.; VARON, R.; GARCÍA-CARMONA, F. 1992. kinetic study of effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **40** 904-8
- (26) RICQUEBOURG, S.L.; CHRISTINE, M-F.; DA SILVA, R.; ROUCH, C.C.; CADET, F.R. 1996. Theoretical support for a conformational change of polyphenol oxidase induced by metabisulfite. *J. Agri. Food Chem.* **44** 3557-60
- (27) GOLAN-GOLHIRSH, A.; WHITAKER, J. R. 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **32** 1003-09
- (28) VALERO, E.; GARCÍA-CARMONA, F. 1998. pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **46** 2447-51
- (29) TANNENBAUM, S. R.; YOUNG, V. R.; ARCHER, M. C. 1993. Vitaminas y minerales. In: Fennema OR Editor *Química de los alimentos*. Acribia: Zaragoza. p 537-613.
- (30) DAO, L.T.; TAKEODA, G. R.; EDWARDS, R. H.; BERRIOS, J. D. J. (1998). Improved Method of the Stabilization of Anthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **46** 3564-69
- (31) VALLEJO, M. C. 1993. *Toxicología y Seguridad de los Alimentos*. Fondo Nacional Universitario: Bogotá. p 184