



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS
COLOIDALES DE α -TOCOFEROL SOBRE LA ACTIVIDAD
POLIFENOLOXIDASA, APLICADAS EN MANZANA 'RED
DELICIOUS' CORTADA-REFRIGERADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

MOISES JOB GALINDO PÉREZ

ASESORES:

M. en C. María de la Luz Zambrano Zaragoza

I.A. Alfredo Álvarez Cárdenas



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
**Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis:**

Influencia del tamaño de partículas coloidales de α -tocoferol sobre la actividad polifenoloxidasas, aplicadas en manzana 'Red Delicious' cortada-refrigerada.

Que presenta el pasante: **Moises Job Galindo Pérez**
Con número de cuenta: 405095779 para obtener el Título de: Ingeniero en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 30 de agosto de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
VOCAL	I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez	
SECRETARIO	M. en C. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza	
1er SUPLENTE	Dra. Ma. de los Ángeles Cornejo Villegas	
2do SUPLENTE	I.A. Pablo Leodegario Navarro González	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Humberto** y **Georgina**, por su gran esfuerzo que han dedicado para que tengamos una carrera, además de enseñarnos que con poco se pueden realizar grandes cosas.

A mis hermanos **Ezel** y **Humberto**, por tantas discusiones llenas de conocimientos que más allá de distanciarnos, nos han servido para aprender uno del otro.

A los grandes amigos de la carrera con quienes he pasado momentos inigualables dentro y fuera de las aulas de clase.

A los asesores, la **M. en C. María de la Luz Zambrano Zaragoza** y el **I.A. Alfredo Álvarez Cárdenas**, que me apoyaron en todo momento y en diferentes circunstancias durante la realización de esta tesis.

Al **Dr. David Quintanar Guerrero** y al grupo de trabajo de **Tecnología Farmacéutica**, por su apoyo incondicional, además de permitirnos trabajar en su laboratorio.

A los profesores de la Facultad en especial al profesor de náhuatl **Víctor Linares Aguirre** quienes han sido parte fundamental en mi formación.

A la **UNAM**, es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios.

A los **Sinodales**, que con sus observaciones han aumentado la calidad de este trabajo.

No menos importante a **Verónica** quien me ha apoyado y ayudado en todo momento, a nunca claudicar y haber hecho que la etapa de experimentación fuera más agradable. Por esto y más, te agradezco infinitamente. Gracias por cruzarte en mi vida.

“La manera como se presentan las cosas no es la manera como son; y si las cosas fueran como se presentan la ciencia entera sobraría” **Karl Marx**

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIME PE203711 "Fortalecer el área de procesos y sistemas frigoríficos con atmósferas modificadas". De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

Y por el proyecto PAPIIT: IT231511-3 "Nanopartículas en recubrimientos comestibles para la conservación de frutas frescas cortadas" de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

RESUMEN

En este trabajo se investigó el efecto de diversos tratamientos como son: solución de ácido ascórbico, emulsión de acetato de dl- α -tocoferol, nanoemulsión de acetato de dl- α -tocoferol, nanocápsulas de acetato de dl- α -tocoferol, solución TPGS y goma xantana sobre la actividad de la polifenoloxidasas de manzanas variedad 'Red Delicious' cortadas y almacenadas en refrigeración durante 14 días, para correlacionarlo con el cambio en el índice de oscurecimiento y en la concentración de compuestos fenólicos presentes en la superficie cortada de las manzanas. Las nanocápsulas de dl- α -tocoferol mostraron los mejores resultados con respecto al índice de oscurecimiento, con lo cual se logró aumentar la vida útil de las manzanas una semana con respecto al tratamiento control y dos días más con respecto a uno de los tratamientos ampliamente utilizados para controlar el oscurecimiento enzimático como lo es el ácido ascórbico. Esto indica que existe un efecto de los compuestos presentes en las nanocápsulas para inhibir el oscurecimiento enzimático. De acuerdo con los resultados obtenidos, se propuso el mecanismo por el cual el acetato de dl- α -tocoferol reacciona para inhibir el oscurecimiento enzimático mediante una analogía con el ácido ascórbico ya que ambos tratamientos presentaron un comportamiento similar con respecto a la actividad polifenoloxidasas aumentando a lo largo del periodo de almacenamiento, obteniendo un máximo de actividad enzimática para el ácido ascórbico de 2467.5 U/ml en el décimo día y para las nanocápsulas 2348.33 U/ml en el doceavo día con la subsecuente disminución de dicha actividad; además, este incremento en la actividad se relacionó cualitativamente con un aumento significativo en el índice de oscurecimiento; por lo tanto, la actividad polifenoloxidasas tiene un mayor efecto sobre el oscurecimiento que la concentración de compuestos fenólicos en manzanas. En los demás tratamientos que contienen α -tocoferol este comportamiento se observó en los primeros días de almacenamiento, debido a las propiedades surfactantes de los compuestos que conforman estos recubrimientos. Con respecto a la emulsión y nanoemulsión no hubo diferencia en el índice de oscurecimiento ni en la actividad de la polifenoloxidasas ya que ambos tratamientos tuvieron prácticamente la misma talla de partícula después de haber recubierto las manzanas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	vii
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	
1.1 Generalidades de las manzanas	1
1.2 Alimentos frescos cortados	3
1.3 Efectos fisiológicos provocado por los cortes	4
1.4 Compuestos fenólicos	7
1.4.1 Biosíntesis de los compuestos fenólicos	9
1.5 Oscurecimiento enzimático	11
1.6 Polifenoloxidasa (PFO)	12
1.6.1 Polifenoloxidasa en plantas	14
1.6.2 Estructura y mecanismo catalítico de la polifenoloxidasa	15
1.7 Inhibidores del oscurecimiento enzimático	17
1.7.1 Métodos químicos	19
1.7.2 Métodos físicos	21
1.8 Nanotecnología	24
1.8.1 Métodos de obtención de nanopartículas y nanodispersiones	27
1.8.2 Caracterización de los sistemas coloidales	30
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL	
2.1 Objetivo general	33
2.1.1 Objetivos particulares	33
2.1.2 Justificación de variables	33
2.2 Materiales	35
2.2.1 Reactivos	35
2.2.2 Material vegetal	35
2.3 Métodos	36
2.3.1 Caracterización de la cámara de refrigeración	36
2.3.2 Preparación de los sistemas coloidales	36
2.3.3 Caracterización de los sistemas coloidales	37
2.3.4 Aplicación de los tratamientos	38
2.3.5 Determinación del índice de oscurecimiento	38

2.3.6 Determinación de la actividad de la polifenoloxidasa	38
2.3.7 Medición de fenoles totales	39
2.4 Análisis estadístico	40

CAPÍTULO III: ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la cámara de refrigeración	41
3.2 Estandarización de los métodos de medición	42
3.2.1 Estandarización de la técnica para la determinación de la actividad polifenoloxidasa	43
3.2.2 Estandarización de la técnica Folin-Ciocalteu	45
3.3 Caracterización de los sistemas coloidales	47
3.4 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el índice de oscurecimiento de manzanas ‘Red Delicious’ cortadas y refrigeradas	51
3.5 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de la polifenoloxidasa en manzanas ‘Red Delicious’ cortadas y refrigeradas	54
3.6 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración de fenoles totales en la superficie de las manzanas ‘Red Delicious’ cortadas y refrigeradas	63
3.7 Relación entre la actividad polifenoloxidasa y el índice de oscurecimiento en manzanas ‘Red Delicious’ con los diferentes tratamientos	65
3.8 Relación entre la concentración de fenoles totales y el índice de oscurecimiento en manzanas ‘Red Delicious’ con los diferentes tratamientos	66

CONCLUSIONES	70
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA	72
--------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Composición química de la manzana de acuerdo con diferentes autores	2
Tabla 2 :	Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo al número de carbonos	8
Tabla 3:	Propiedades químicas y moleculares de las polifenoxidasas	13
Tabla 4:	Procedimientos usados para limitar el oscurecimiento	18
Tabla 5:	Ejemplos de los diferentes usos de la nanotecnología en alimentos	26
Tabla 6:	Tabla de variables	34
Tabla 7:	Actividad enzimática PFO de manzanas 'Red Delicious' sin tratamiento	44
Tabla 8:	Concentración de fenoles totales presentes en las manzanas 'Red Delicious' sin tratamiento	46
Tabla 9:	Tamaño de partícula e índice de polidispersión de los sistemas coloidales almacenados durante seis semanas	48
Tabla 10:	Potencial Zeta de los sistemas dispersos durante seis semanas de almacenamiento	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de las principales rutas y las enzimas claves involucradas en la síntesis de taninos hidrolizables, ácido salicílico, hidroxicinamatos, 5-cafeoilquinico	10
Figura 2:	Reacciones que cataliza la enzima polifenoloxidasas	13
Figura 3:	Estructura conformacional de PFO de tubérculos de camotes (<i>Ipomea batata</i>)	15
Figura 4:	Propuesta cinética que presenta los mecanismos de oxidación de o-difenoles y monofenoles	16
Figura 5:	Mecanismo de acción de los compuestos reductores	20
Figura 6:	Características de las nanopartículas	25
Figura 7:	Esquema de la partícula cargada y las cargas que se le unen	32
Figura 8:	Caracterización térmica de la cámara de refrigeración	41
Figura 9:	Humedad relativa dentro de la cámara de refrigeración	42
Figura 10:	Medición de la transformación del catecol a o-benzoquinona	43
Figura 11:	Curva patrón de ácido gálico	45
Figura 12:	Estructura primaria de la goma xantana	49
Figura 13:	Micrografías de los recubrimientos aplicados sobre manzanas 'Red Delicious' cortadas.	50
Figura 14:	Índice de oscurecimiento de la superficie cortada de manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos y almacenadas durante 14 días.	52
Figura 15:	Actividad polifenoloxidasas en manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos almacenadas durante 14 días.	55
Figura 16:	Actividad PFO en las manzanas tratadas con ácido ascórbico y nanocápsulas.	56
Figura 17:	Mecanismo por el cual el α -tocoferol inhibe el oscurecimiento enzimático.	58
Figura 18:	Actividad PFO en manzanas tratadas con nanoemulsión y emulsión almacenadas durante 14 días.	59

Figura 19:	Micrografías de las vesículas formadas en la superficie de las manzanas cortadas con los recubrimientos de nanoemulsión y de emulsión	60
Figura 20:	Índices de oscurecimientos obtenidos para las manzanas tratadas con nanoemulsión y emulsión de acetato de dl- α -tocoferol.	60
Figura 21:	Actividad PFO e índice de oscurecimiento en manzanas ‘Red Delicious’ tratadas con xantana.	61
Figura 22:	Actividad polifenoloxidasa e índice de oscurecimiento en manzanas tratadas con solución de TPGS.	62
Figura 23:	Contenido de fenoles totales en la superficie cortada de las manzanas ‘Red Delicious’ con los diferentes tratamientos.	64
Figura 24:	Relación entre la actividad PFO y el índice de oscurecimiento en manzanas ‘Red Delicious’ con los diferentes tratamientos.	67
Figura 25:	Relación entre la concentración de fenoles y el índice de oscurecimiento en manzanas ‘Red Delicious’ con los diferentes tratamientos.	68

INTRODUCCIÓN

La manzana es una de las frutas más consumidas en el mundo y tiene una gran cantidad de compuestos fenólicos como: ácido *p*-coumaroilquinico, catequinas, epicatequinas, procianidinas, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (Amiot *et al.*, 1992). Los polifenoles de la manzana tienen varias propiedades fisiológicas *in vivo* e *in vitro*: actividades antialérgicas, anticaries e inhibidores contra algunas enzimas (Shoji *et al.*, 2004); así mismo, reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, algunos cánceres, asma y diabetes (Amiot *et al.*, 1992; Tsao *et al.*, 2003; Yahia, 2010).

El cambio en el estilo de vida ha producido un incremento en el consumo de frutas y vegetales frescos cortados (Olivas y Barbosa-Canóvas, 2005). Sin embargo, el daño en los tejidos por pelado o cortado de las frutas y vegetales resulta en la oxidación de compuestos fenólicos que contribuyen significativamente a la pérdida de calidad. La polifenoloxidasa (PFO) es un término genérico para el grupo de enzimas que catalizan la oxidación de estos compuestos (Whitaker y Lee, 1995).

El oscurecimiento enzimático ha sido controlado a través de métodos físicos y químicos, y en muchos casos ambos son empleados (García y Barrett, 2003). Se han utilizado compuestos químicos naturales y sintéticos para disminuir el oscurecimiento enzimático en las frutas y vegetales frescos cortados. Agentes quelantes como dietilditiocarbamato, azida y EDTA inhiben la PFO debido a que interactúan con los grupos prostético de cobre, la polivinilpirrolidona liga a los substratos fenólicos así se previene su conversión a quinonas, las ciclodextrinas forman complejos de inclusión con varios compuestos orgánicos e inorgánicos, los agentes reductores como el ácido ascórbico y sus derivados que transforman a las quinonas formadas al sustrato fenólico original y los sulfitos que son compuestos muy versátiles; sin embargo, su uso en alimentos está restringido (Sapers *et al.*, 1989). Entre los métodos físicos se encuentran los tratamientos térmicos, la exclusión de oxígeno, el uso de atmósferas modificadas y la utilización de recubrimientos comestibles.

Una nueva generación de recubrimientos comestibles está bajo desarrollo con el objetivo de permitir la incorporación y/o liberación controlada de compuestos activos

utilizando soluciones nanotecnológicas. Los nanorecubrimientos pueden incluir varios agentes funcionales como son antimicrobianos, antioscurecimiento, antioxidantes, enzimas, aromas, colorantes y nutraceuticos (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Actualmente los principales enfoques de la nanotecnología en alimentos han sido la innovación de envases, los ingredientes en nanoescala o nanoencapsulados y los nanotransportadores para la liberación de nutrientes y suplementos alimenticios (Chaudhry *et al.*, 2010). Son pocos los trabajos utilizando nanocompuestos directamente sobre alimentos. An *et al.* (2008), realizaron un recubrimiento a base de nanopartículas de plata, concluyendo que dicho tratamiento disminuye la pérdida de peso, de ácido ascórbico y clorofilas; además, reduce los cambios en el color y controlan el crecimiento microbiano en espárragos verdes, lo que conlleva a aumentar la vida útil de este producto. Costa *et al.* (20011) también han utilizado nanopartículas de plata para inhibir el crecimiento microbiano en una mezcla de kiwis y piñas, incrementando la vida útil de estos productos alrededor de cinco días con respecto al control.

Trabajos recientes han demostrado que las nanocápsulas cargadas de acetato de dl- α -tocoferol como sustancia activa disminuyen la pérdida de peso y tienen un efecto sobre los cambios bioquímicos reduciendo el oscurecimiento y la senescencia cuando son aplicadas en manzanas 'Red Delicious' cortadas-refrigeradas (Sánchez-Reyes, 2011). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es investigar el efecto de distintos tratamientos que contienen acetato de dl- α -tocoferol con diferentes tamaños de partícula sobre la actividad de la polifenoloxidasas de manzanas 'Red Delicious' cortadas-refrigeradas, relacionándolo con el índice de oscurecimiento y la concentración de compuestos fenólicos presentes en la superficie cortada de las manzanas.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de las manzanas

a) Clasificación taxonómica

Las manzanas pertenecen a la familia de las *Rosaceae*, subfamilia *Maloideae*. Los frutos *Maloideae* tienen un núcleo carnoso en el interior y una corteza exterior. (Jackson, 2003). Otros miembros de esta subfamilia que se cultivan por sus frutos como: peras (*Pyrus L. spp.*), membrillos (*Cydonia oblonga* Mill) y nísperos (*Eriobotrya Japonica* Mill.). La manzana común domesticada es adaptada de un complejo de híbridos con similitudes biológicas, usualmente designado *Malus x domestica* Borkh o *M. domestica* Borkh (Luby, 2003), su antepasado principal es *M. Sieversii*, con contribuciones de *M. Silvestris*, *M. orientalis*, *M. baccata*, *M. mandshurica*, y *M. prunifolia* (Jackson, 2003; Luby, 2003).

Existen diferentes variedades de *Malus Domestica* Borkh destacando la variedad “Delicious” (Golden Delicious, Red Delicious y Starking Delicious) por ser de las más cultivadas y consumidas a nivel mundial (Nuñez *et al.*, 1996). Son frutas climatéricas, crecen fácilmente en zonas climáticas templadas (entre 30° y 60°, norte y sur) pero actualmente se han desarrollado cultivos más resistentes al calor debido a la creciente popularidad de las variedades que requieren una larga estación de crecimiento (O’Rourke, 2003; Sinha, 2006).

b) Composición química de las manzanas

Típicamente las manzanas contienen aproximadamente 85% de agua, de 12 a 14% de carbohidratos, cerca de 0.3% de proteína, minerales, vitaminas, una insignificante cantidad de lípidos menor a 0.10%, el contenido total de fibra es alrededor de 2% y el ácido málico es el principal ácido orgánico encontrado en las manzanas (0.3 a 1.0%). La cantidad presente de estos compuestos puede variar considerablemente debido a las diferencias en el crecimiento, localización, variedad, madurez de la cosecha, condiciones agronómicas y ambientales (Sinha, 2006). Diferencias mínimas en la composición química con respecto a otras autores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición química de la manzana de acuerdo con diferentes autores

Componente	Valor por 100 gramos de porción comestible		
	Souci <i>et al.</i> (1999)	Moreiras <i>et al.</i> (2005)	USDA (2011)
Energía (Kcal)	54	46	52
Agua (g)	85.3	85.7	85.56
Proteína (g)	0.3	0.3	0.26
Lípidos totales (g)	0.4	Tr	0.17
Hidratos de carbono (g)	11.8	12	13.81
Cenizas (minerales) (g)	0.3	0.13	0.19
Fibra (g)	2.3	2	2.4
Potasio (mg)	145	120	107
Calcio (mg)	7	6	6
Magnesio (mg)	6	5	5
Vitamina C (mg)	12	10	4.6
Vitamina E (µg)	490	200	180
Carotenos (µg)	45	30	27

Tr: Trazas (la cantidad de nutriente está por debajo de los límites de análisis de la técnica)

Las manzanas *Malus domestica* Borkh son fuente rica en fitoquímicos, incluyendo compuestos fenólicos, pigmentos, vitamina C y E, entre otros. Hay seis clases de polifenoles en las manzanas, las antocianinas y los glucósidos de flavonol son mayormente encontrados en la piel, también contiene ácidos fenólicos como el ácido clorogénico y el ácido coumaroilquinico, dihidrochalconas, catequinas y procianidinas. Muchos estudios epidemiológicos han demostrado la inversa correlación entre el consumo de manzana y los productos relacionados con afecciones crónicas, enfermedades degenerativas como algunos cánceres, diabetes y cataratas (Amiot *et al.*, 1992; Tsao *et al.*, 2003; Wojdylo *et al.*, 2008; Yahia, 2010).

El consumo de manzanas es principalmente en fresco ya que es mucho más rentable que la transformación en zumos y jugos, aunque también se utiliza para sidras y brebajes (Luby, 2003).

El cambio en el estilo de vida ha propiciado la necesidad de alimentos que ofrecen conveniencia como son: alimentos que minimizan el tiempo de preparación, listos para su consumo y de servicio individual; además, ofrezcan alta calidad a lo largo de su vida útil (Blakistone, 1999).

1.2 Alimentos frescos cortados

Los alimentos frescos cortados son alimentos inocuos, sanos cuando son preparados bajo Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y procedimientos de saneamiento adecuados (Garrett, 2002). Snyder (2003), definió los alimentos mínimamente procesados como: “aquellos en donde los componentes biológicos, químicos y riesgos físicos se encuentran en un nivel aceptable”.

La Asociación Internacional de Productos Frescos Cortados (IFPA, por sus siglas en inglés) indican que las frutas y vegetales frescos cortados inicialmente llamados mínimamente procesados o productos ligeramente procesados, son cualquier fruta fresca o vegetal que ha sido físicamente modificado de su forma original (por pelado, cortado, lavado) para obtener un producto 100% comestible que es subsecuentemente embolsado o empacado y almacenado bajo refrigeración (Garrett, 2002; Rojas-Graü *et al.*, 2011). Por otra parte, Olivas y Barbosa-Canóvas (2005) definen el término “frutas mínimamente procesadas” como: “un tipo de fruta que ha sido físicamente alterada de su estado original (recortada, pelada, lavada y/o cortada) pero permanece fresca”. Por lo tanto, en adelante se utilizará el término como “frutas frescas cortadas”, ya que las terminologías sobre las frutas mínimamente procesadas y las frutas frescas cortadas son idénticas.

La principal ventaja de estos productos es la comodidad y el ahorro de tiempo ya que en la mayoría de los casos están listos para ser consumidos (Wiley, 1997). Los productos frescos cortados incluyen cualquier clase de producto fresco y sus mezclas en diferentes cortes y empaques. Productos como ensaladas en bolsas, zanahorias baby, mezclas de vegetales sofritos y frutas frescas cortadas como manzana, piñas, sandías o melones, son únicamente algunos ejemplos de este tipo de productos (Rojas-Graü *et al.*, 2011).

La refrigeración y envasado pueden ser una etapa opcional en productos vegetales intactos pero son obligatorios para las frutas y hortalizas frescas cortadas (Wiley, 1997).

Los alimentos frescos cortados requieren conservar la cadena de frío a temperaturas de refrigeración o ligeramente más altas dependiendo del producto base o la mezcla de productos que se trate. Los alimentos congelados no son similares a los frescos cortados ya que estos deben transportarse y almacenarse a temperaturas de -10°C o inferiores; por lo cual, la calidad global del alimento congelado es diferente al que presentan los alimentos frescos cortados (Wiley, 1997).

El envase para los alimentos frescos cortados debe prevenir la transmisión de los gases así como las pérdidas por difusión de vapor de agua, proteger al contenido de agentes biológicos, mecánicos y físicos externos durante el almacenamiento, transporte y comercialización, suministrar un nivel aceptable o mínimo de interacción material de envasado/contenido, conservar el contenido y prevenir o retardar directa o indirectamente la descomposición química o disminución de la calidad del producto envasado (Schlimme y Rooney, 1997).

Las frutas y vegetales frescos cortados, se deterioran mucho más rápidamente que los productos intactos como resultado directo de las heridas asociadas al procesamiento, el cual conduce a un número de cambios físicos y fisiológicos que afectan la calidad del alimento. Los síntomas de deterioro de productos frescos cortados incluyen cambios en la textura (flacidez debido a pérdida de agua en los tejidos), en el color especialmente atribuido al oscurecimiento oxidativo en las superficies cortadas y riesgos de contaminaciones microbiológicas. Dichos cambios reducen la vida útil de los productos frescos cortados (Rojas-Graü, 2006).

1.3 Efectos fisiológicos provocados por los cortes.

Los daños en los tejidos ponen en marcha una serie de eventos que resultan en el incremento de la respiración en los sitios dañados, la producción de etileno, la acumulación de metabolitos secundarios y la disrupción celular que conduce a la descompartimentación de las enzimas y sus sustratos. Esta respuesta fisiológica de las frutas y vegetales frescos cortados se ve reflejada en la pérdida de calidad (Rolle y Chism

III, 1987). Los cambios bioquímicos producidos por los cortes de los tejidos se detallan a continuación:

a) Producción de etileno

Las heridas sobre los tejidos inducen la producción de etileno y esta respuesta puede ocurrir en pocos minutos hasta después de una hora después del corte, con las máximas velocidades de producción de etileno entre 6-12 horas. Los efectos potenciales de la producción de etileno debido por los cortes, son dependientes del tipo y fisiología del tejido en cuestión. La producción de etileno es consecuencia del metabolismo de lipoxigenasas debido a la presencia de ácidos grasos libres (Toivonen y DeEll, 2002). Además, el etileno es un promotor de la senescencia y acelera el deterioro, la mayoría de los cambios en el color, sabor y textura producidos en las frutas pos-cosecha son directa o indirectamente afectados por el etileno (Rolle y Chism III, 1987).

b) Respiración

Los cortes en los tejidos dan como resultado un incremento en la respiración, pero el inicio a esta respuesta es tardado, comparado con la producción de etileno. Se ha asumido que el incremento en la respiración se debe a la respiración aeróbica mitocondrial. Esta asunción se apoya en los cambios ocurridos en la estructura mitocondrial y el incremento en el número de funciones (Toivonen y DeEll, 2002).

c) Pérdida de agua

La pérdida de agua en frutas y vegetales es influenciada por muchos factores probablemente el más importante es la resistencia de la peridermis exterior o cutícula al movimiento transpiracional de vapor de agua. Sin embargo, el pelado o cortado resulta en la reducción o eliminación de estas barreras a la transpiración. Dos cuestiones son importantes en la pérdida de agua: la reducción de la mayor parte del tejido con el incremento del área superficial en relación al volumen y la eliminación de los tejidos peridermis de protección (Toivonen y DeEll, 2002).

d) Susceptibilidad al deterioro por microorganismos

El tipo de alimento tiene gran importancia en el tipo de microorganismo que en última instancia se puede desarrollar. Por ejemplo, los hongos tienen una ventaja

competitiva en frutas, debido a que estas tienen un pH más ácido. En contraste, el pH más neutral de muchos vegetales permiten a las bacterias ser más exitosas. En frutas se pueden encontrar microorganismos del género *alternaria*, *aspergillus*, *gloeodes*, *monilinia*, entre otros, mientras que en vegetales se encuentran *salmonella* (*Salmonella Typhi*, *Salmonella spp.*), *shigella*, *vibrio chloreae*, *listeria monocytogenes* y *bacillus cereus* (Brackett, 1987).

Los aumentos en las poblaciones microbianas de los alimentos frescos cortados son a menudo asociados con un incremento en las tasas de respiración con el tiempo de almacenamiento, la desintegración del tejido está estrechamente asociada con la actividad microbiana, que producen enzimas degradadoras de pectinas provocando el ablandamiento de los tejidos y la descomposición. Se pueden encontrar conteos microbianos relativamente altos en productos de calidad aceptable. Los tejidos dañados y las células rotas proporcionan nutrientes y un ambiente para la mayor parte de la microflora, esto se demuestra por el hecho de que el crecimiento microbiano es mucho mayor en alimentos frescos cortados en relación con un alimento intacto (Toivonen y DeEll, 2002).

e) *Deterioro de la membrana*

El deterioro de la membrana provoca la separación o división de la estructura celular y la pérdida de las funciones normales celulares (Toivonen y DeEll, 2002). Debido a que los principales ácidos grasos que poseen los vegetales son los ácidos linolénico y linoleico (ácidos grasos poliinsaturados), son liberados de los glicéridos, glicolípidos y fosfolípidos por acción de las lipasas e hidrolasas. La oxidación posterior de estos ácidos grasos por la lipooxigenasa produce los correspondientes hidroperóxidos que a su vez son convertidos por diferentes enzimas en una mezcla compleja de compuestos, dando lugar a la degradación enzimática de los componentes de la membrana (Rolle y Chism III, 1987; Zamora *et al.*, 1991).

Las enzimas activas acilhidrolasas y fosfolipasas provocan la producción de ácidos grasos libres de los componentes de la membrana, los cuales pueden interrumpir las funciones celulares mediante la lisis de los organelos e inactivación de las proteínas. Los radicales libres generados como productos de las actividades enzimáticas, son capaces de atacar las proteínas de las membranas contribuyendo a su futura desintegración, esta actividad puede ser algo reducida por la presencia de antioxidantes naturales dentro de la

bicapa lipídica de la membrana. El significado fisiológico de esta cascada de reacciones puede estar implicado en procesos de daño en los tejidos, las consecuencias más evidentes son el desarrollo de olores, sabores, oscurecimiento y la senescencia (Rolle y Chism III, 1987; Toivonen y DeEll, 2002; Zamora *et al.*, 1991).

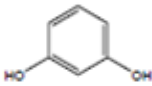
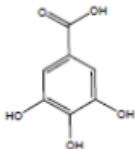
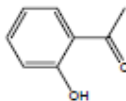
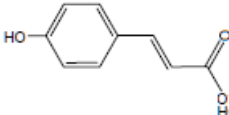
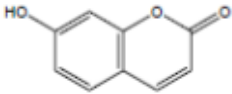
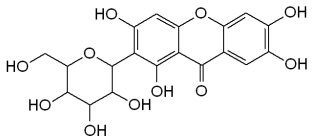
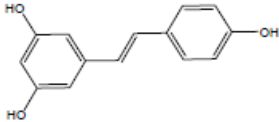
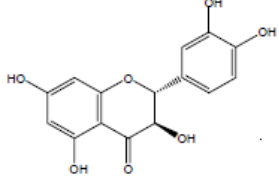
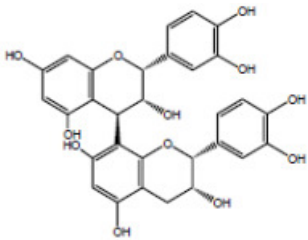
f) Acumulación de metabolitos secundarios

La acumulación de fenoles es uno de los fenómenos más estudiados en respuesta al troceado de frutas y verduras. Las heridas en los tejidos tienen dos efectos sobre el metabolismo de los fenoles, el primero es la oxidación de los compuesto fenólicos endógenos como una consecuencia de la ruptura de la membrana celular lo que permite la mezcla de estos compuestos con sistemas enzimáticos oxidativos que están separados por membranas (Toivonen y DeEll, 2002), generando quinonas altamente inestables que posteriormente se polimerizan para formar melaninas, que se ha encontrado poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas para protección de los daños provocados por insectos y herbívoros (Vermerris y Nicholson, 2006). El segundo es la estimulación de células adyacentes por la lesión para producir más compuestos fenólicos en un esfuerzo de comenzar los procesos de respiración (Toivonen y DeEll, 2002). Es bien conocido que la fenilalanina amoniliasa (PAL) es la enzima clave de la ruta de los fenilpropanoides, catalizando el primer paso en la biosíntesis de estos compuestos (González-Aguilar *et al.*, 2010).

1.4 Compuestos fenólicos

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo funcional hidroxilo unido a un anillo aromático llamados fenoles, los polifenoles son compuestos que tiene más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos de benceno (Taiz y Zeiger, 2002; Vermerris y Nicholson, 2006). Aproximadamente 10,000 estructuras fenólicas han sido reportadas y están ampliamente dispersas a través del reino vegetal (Crozier *et al.*, 2006; Saltveit, 2010; Taiz y Zeiger, 2002). Algunos son solubles únicamente en solventes orgánicos, otros son solubles en agua, en ácidos carboxílicos y glucósidos y otros son grandes polímeros insolubles (Crozier *et al.*, 2006; Taiz y Zeiger, 2002). Pueden ser clasificados en base al número de sus átomos de carbono en el esqueleto (Tabla 2) o en dos grupos: los flavonoides y los no flavonoides.

Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo al número de carbonos.

<i>No. de carbonos</i>	<i>Clase</i>	<i>Ejemplo</i>	<i>Estructura</i>
C ₆	Fenoles simples	Resorcinol	
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados	Ácido gálico	
C ₆ -C ₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos	2-hidroxiacetofenona	
C ₆ -C ₃	Ácidos cinámicos, cinamil aldehídos, cinamil alcohol	Ácido <i>p</i> -cumárico	
C ₆ -C ₃	Cumarinas, isocumarinas y cromonas	Umbeliferona	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas y xantonas	Mangiferin	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	Resveratrol	
C ₁₅	Flavonoides (flavanes, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianinas, antocianidinas)	Dihidroquercetina	
C _n	Oligómeros o polímeros (taninos, ligninas)	Taninos condensados	

Fuente: Vermerris y Nicholson, 2006.

Los flavonoides son polifenoles que contienen 15 carbonos con dos anillos aromáticos unidos por un puente formado por tres carbonos, son los más numerosos de los polifenoles y los no flavonoides comprenden al resto de los compuestos fenólicos. Entre los no flavonoides más importantes para la dieta se encuentran los ácidos fenólicos, los cinamatos y sus derivados, los polifenoles estilbenos y más notablemente el ácido gálico que es el precursor de los taninos hidrolizables (Figura 1) (Crozier, 2006).

1.4.1 Biosíntesis de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sintetizados por varias rutas diferentes. Las dos vías básicas son la ruta del ácido shikímico y la del ácido malónico (Figura 1). La primera participa en la biosíntesis de compuestos fenólicos en la mayoría de las plantas. Mientras que la vía del ácido malónico aunque una fuente secundaria importante de compuestos fenólicos producto de hongos y bacterias es de menor importancia en las plantas superiores (Taiz y Zeiger, 2002).

La ruta del ácido shikímico convierte a los carbohidratos simples derivados de la glucólisis y la ruta de la pentosa fosfato en aminoácidos aromáticos. La ruta está presente en hongos, plantas y bacterias, pero no se encuentra en los animales, debido a que no pueden sintetizar aminoácidos aromáticos como son: fenilalanina, triptófano y tirosina que son nutrientes esenciales en la dieta animal (Taiz y Zeiger, 2002).

Las clases más abundantes de compuestos fenólicos son derivados de la fenilalanina a través de la eliminación de una molécula de amoníaco para formar ácido cinámico, la fenilalanina amoníalíasa cataliza la reacción de liberación de la molécula de amoníaco; además, forma una doble ligadura entre carbono y carbono. Se encuentra en un punto entre el metabolito primario y secundario; debido a esto, la reacción que cataliza es un paso importante en la regulación de la formación de muchos compuestos fenólicos. La actividad de la PAL es incrementada por factores ambientales, como son: bajos niveles de nutrientes, la luz, la infección fúngica y daños en los tejidos (Saltveit, 2010; Shahidi y Neczk, 2004; Taiz y Zeiger, 2002).

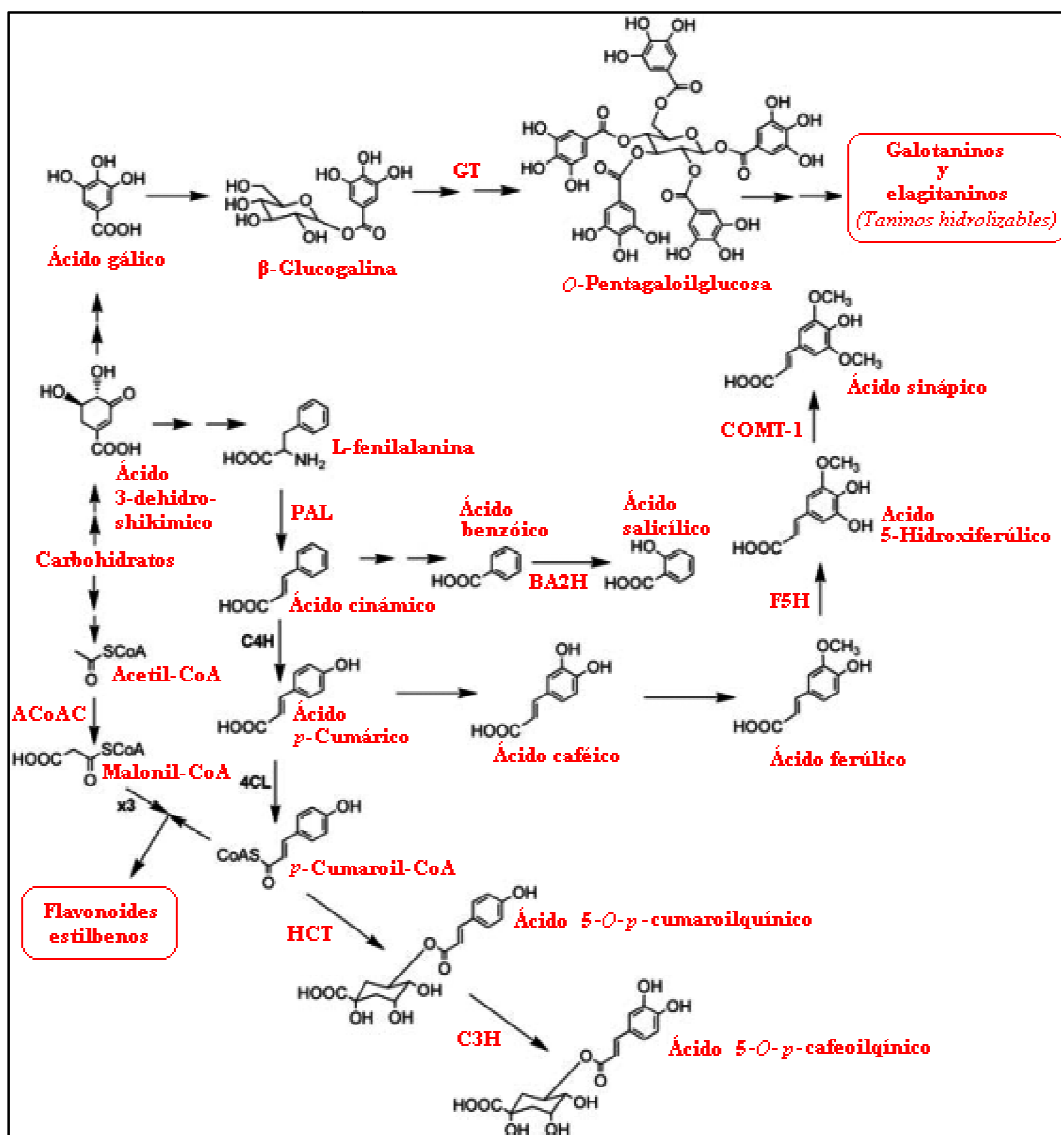


Figura 1: Esquema de las principales rutas y las enzimas claves involucradas en la síntesis de taninos hidrolizables, ácido salicílico, hidroxicinamatos, 5-cafeoilquinico. Las abreviaciones de las enzimas: PAL (Fenilalanin amoniliasa), BHA2H (Ácido benzoico 2-hidroxilasa), C4H (Cinamato 4-hidroxilasa), COMT-1 (Ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferulico *O*-metiltransferasa), 4CL (*p*-cumarato: CoA ligasa), F5H (ferulato 5-hidroxilasa), GT (Galoiltransferasa), ACoAC (acetilCoA carboxilasa). (Adaptado de Crozier *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos desempeñan funciones importantes en los vegetales, siendo las más relevantes la de protección frente a radiación ultravioleta (estilbenos), actúan como agentes antimicrobianos y antifúngicos (ácido salicílico), mediante el sellado de heridas por lignificación (ligninas) entre otras (Salvet, 2010; Taiz y Zeiger, 2002; Vermerris y Nicholson, 2006).

La composición cualitativa y cuantitativa de fenoles en los tejidos vegetales varía considerablemente según la especie de que se trate, grado de madurez de los frutos y manejo pos-cosecha de los mismos. Además, para una misma especie el contenido de fenoles es dependiente de la variedad (Taiz y Zeiger, 2002).

De acuerdo con Tsao *et al.* (2003), en las manzanas se han identificado cinco clases diferentes de compuestos fenólicos; ácidos hidroxicinámicos, procianidinas, antocianinas, flavonoles y dihidrochalconas. Dichos autores indican que las manzanas de la variedad 'Red Delicious' y 'Northern Spy' tienen la mayor concentración de compuestos fenólicos tanto en el mesocarpio como en el exocarpio. En las manzanas 'Red Delicious' se encuentran compuestos fenolicos como son: ácido colrogénico, ácido *p*-cumaroilquinico, catequinas, epicatequinas, procianidinas B1, procianidinas B2, quercetinas (quercetina 3-galactosida, quercetina 3-glucosida, quercetina 3-xilosida quercetina 3-arabinosida, quercetina 3-rhabnosida), floretinas y floridizinas (Amiot *et al.*, 1992; Tsao *et al.*, 2003).

Al cortar o triturar las frutas para diferentes procesos (extracción de zumos, purés), las células se rompen y se liberan diversos componentes que tienen contacto con el oxígeno atmosférico. Esta incorporación de oxígeno en la pulpa o superficie cortada de las fruta y vegetales, provoca la oxidación de los compuestos fenólicos, que se encuentran naturalmente en el vegetal. La polifenoloxidasas (PFO) es una enzima endógena que cataliza la oxidación conocida como oscurecimiento enzimático (Lozano, 2006).

1.5 Oscurecimiento enzimático

La apariencia de las frutas es significativamente afectada por el color. El color está influenciado por pigmentos de origen natural, tales como, clorofilas, carotenoides, y antocianinas o por los pigmentos resultantes de las reacciones de oscurecimiento.

Uno de los principales cambios bioquímicos asociados al procesamiento mínimo de elaboración es el oscurecimiento enzimático. El fenómeno de oscurecimiento de frutos y vegetales es un problema de gran importancia en la industria alimentaria y se reconoce como una de las principales causas de pérdidas de calidad. En las reacciones de oscurecimiento se producen cambios importantes tanto en la apariencia (colores oscuros) como en las propiedades organolépticas (sabor, textura) de frutas y vegetales comestibles,

y suele ir asociado al desprendimiento de olores y efectos negativos sobre el valor nutricional (Amiot *et al.*, 1992). El desarrollo del color debido a la actividad PFO es deseable en los procesos de té, café, cocoa, sidra de manzana, ciruelas pasas, pasas, higos y zapotes (Ramírez y Whitaker, 2003).

En la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos, participan dos enzimas que son relevantes en términos de calidad de frutos y vegetales por la formación de melaninas que oscurecen los frutos, estas enzimas son la polifenoloxidasas (PFO) y la peroxidasa (POD). A pesar de que las PODs están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, su papel en el oscurecimiento enzimático de frutos y vegetales está todavía bajo discusión debido a que el nivel de H₂O₂ interno en las plantas limita la actividad peroxidasa. Se ha propuesto que la PFO puede actuar como promotor de la POD puesto que en las reacciones de oxidación de compuestos fenólicos se genera H₂O₂. El estado antioxidante de diferentes frutos y vegetales puede decrecer por la oxidación directa de los compuestos fenólicos en presencia de PFO y POD. Sin embargo, la principal enzima responsable del oscurecimiento enzimático es la PFO, aunque no debe ser excluido un posible efecto sinérgico entre PFO y POD (Sellés-Marchat, 2007).

1.6 Polifenoloxidasas (PFO)

La polifenoloxidasas es un término genérico para el grupo de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a productos de color café en la superficie de frutas y vegetales, fue descubierta en setas en 1856 por Schoenbein. Es una metaloproteína y se ha demostrado que contiene un centro dinuclear de cobre (Lozano, 2006; Mayer y Harel, 1979; Whitaker y Lee, 1995).

Basada en la especificidad del sustrato, el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, por sus siglas en inglés) ha designado monofenol monooxigenasa, creseolasa o tirosinasa como EC 1.14.18.1, difenoloxidasas, catecoloxidasas o difenol oxigenoxireductasa como EC 1.10.3.2 y lacasa o *p*-difenol oxigenoxireductasa como EC 1.10.3.1 (Whitaker y Lee, 1995). La primera nomenclatura es debido a que actúa sobre un monohidroxifenol para hidroxilarlo en la *o*-posición con respecto al grupo hidroxilo original y formar un dihidroxifenol (Figura 2 (a)). El segundo nombramiento se debe a que actúa sobre los *o*-dihidroxifenoles, oxidándolos

por el retiro de hidrógenos de los grupos hidroxilo, formando *o*-benzoquinonas (Figura 2 (b)) y la tercera designación es debido a que actúa sobre *p*-dihidroxifenoles, para retirar los hidrógenos y formar *p*-quinonas (Figura 2 (c)) (Mayer y Harel, 1979; Ramírez y Whitaker, 2003; Whitaker y Lee, 1995).

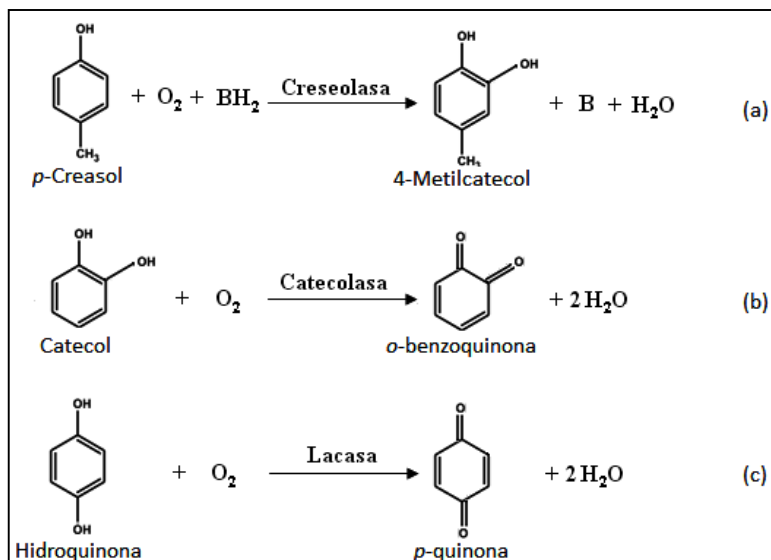


Figura 2: Reacciones que cataliza la enzima polifenoloxidasas. (a) Creosolasa; (b) Catecolasa; (c) Lacasa.

La polifenoloxidasas está ampliamente distribuida en microorganismos (bacterias y hongos), plantas y animales (Tabla 3), donde está involucrada en la biosíntesis de melaninas y otros compuestos polifenólicos (Lerch, 1995).

Tabla 3: Propiedades químicas y moleculares de las polifenoloxidasas.

Especie	Masa molecular (kD)	Masa molecular de las subunidades (kD)	%Cu
Microorganismos			
<i>Streptomyces glaucescens</i>	29	29	0.43
<i>Neurospora crassa</i>	120	46	0.29
Plantas			
<i>Solanum tuberosum</i>	290	36	0.20
<i>Beta vulgaris</i>	40	40	0.31
Animales			
<i>Rana pipiens</i>	200	54	0.15
<i>Homo sapiens</i>	66.7	66.7	0.20

Fuente: Lerch, 1995.

1.6.1 Polifenoloxidasa en plantas

La PFO se ha encontrado en diversos tejidos de plantas así como en raíces. Está presente en duraznos, manzanas, uvas, fresas, plátanos al igual que en papas, lechugas y otras hortalizas de hojas (Ramírez y Whitaker *et al.*, 2003).

La polifenoloxidasa ha sido localizada en una variedad de fracciones celulares, tanto en organelos donde esta puede estar estrechamente ligada a las membranas y en la fracción soluble de las células (Mayer y Harel, 1978). Sin embargo, estas aseveraciones en la localización depende del método de extracción utilizado (Sellés-Marchat, 2007). Las evidencias indican que en los vegetales, la PFO está unida a los cloroplastos particularmente en las membranas tilacoidales, en cambio en los hongos se encuentra en el citoplasma (Mayer y Harel, 1987).

La distribución en las diferentes partes de las frutas y vegetales así como la relación entre las formas ligadas a la membrana y las solubles varían considerablemente. Algunos reportes indican que la PFOs de manzana se encuentran mayormente localizadas en la pulpa más que en la piel; sin embargo, hay estudios que afirman lo contrario (Lamikanra, 2002). Por otra parte, Wakayama (1995) encontró que la actividad de la enzima es mucho mayor en el centro, posteriormente en la pulpa y por último en la piel de cinco variedades de manzanas cultivadas en Japón también mostró que la manzana de la variedad 'Red Delicious' posee la mayor actividad PFO (1570 U/ml).

Estudios recientes sugieren que la PFO de las plantas es sintetizada mediante un precursor proteico. El precursor de la PFO con masa molecular de 67 kDa es importado dentro del estroma de los cloroplastos en un paso dependiente de ATP. Es procesado después en una forma de 62 kDa por una estromapeptidasa. El transporte subsecuente hacia el lumen fue dependiente de la luz y resultó en la forma madura de 59 kDa. Aparentemente este proceso es una característica de todas las PFOs localizadas en los cloroplastos. La importación y la transformación no requiere Cu^{+2} ; sin embargo, concentraciones micromolares pueden inhibir el proceso (Sommer *et al.*, 1994). Investigaciones posteriores revelaron que la concentración excesiva de cobre pudo inhibir a la enzima estromapeptidasa involucrada en la transformación del precursor proteico (Mayer, 2006).

El peso molecular de varias PFOs, depende del tejido y del organismo. Dos rangos de masa molecular a veces pueden ser encontrados incluso en la misma fuente: uno en el rango de 38-45 kDa, y el segundo en el rango de 55-60 kDa. También se encuentran pequeñas enzimas con un peso molecular de 30 kDa, pero son generalmente descritas como derivados proteolizados de la proteína madura (Gerdemann, 2002).

1.6.2 Estructura y mecanismo catalítico de la polifenoloxidasasa

La única estructura determinada hasta la fecha la realizaron Klabunde *et al.* (1998), en tubérculos de camotes, utilizando cristalografía de rayos X. La proteína carecía de una extensión C-terminal; por lo tanto, no existe una estructura resuelta de la proteína madura (Sellés-Marchat, 2007).

La enzima está compuesta por un monómero de 39 kDa de masa molecular, tiene una forma elipsoidal con dimensiones de 55 x 55 x 45 Å. La estructura secundaria es principalmente α -helicoidal con el centro enzimático formado por un paquete de cuatro hélices (Figura 3 (A)). Cada uno de los dos sitios activos de cobre están coordinados por tres residuos de histidina, contribuyendo a formar las cuatro hélices. El Cu A es coordinado por los residuos His 88, His 109 e His 118, mientras que el segundo centro catalítico, el Cu B, está coordinado por la His 240, His 244, y la His 274 (Figura 3 (B)) (Klabunde *et al.*, 1998).

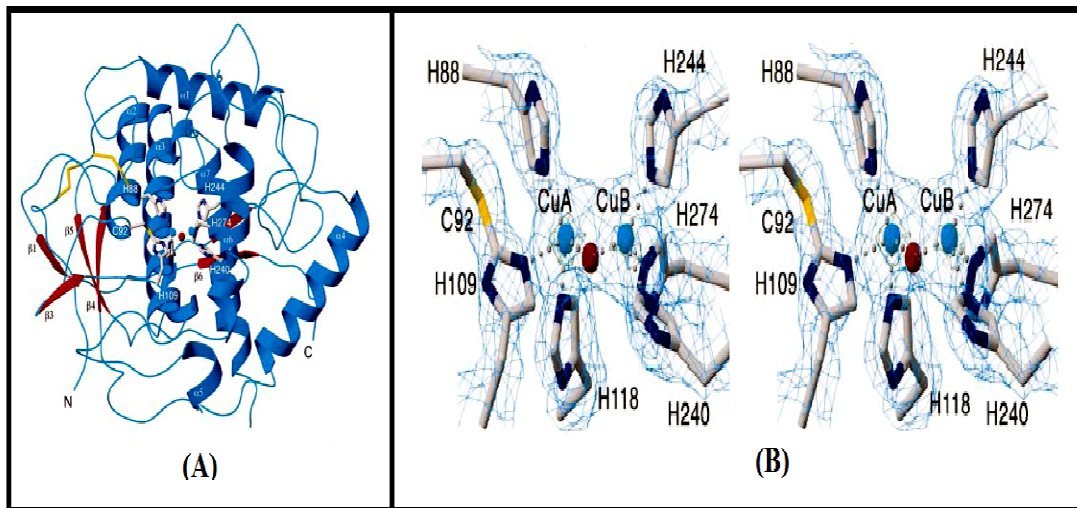


Figura 3: Estructura conformacional de la PFO de tubérculos de camote (*Ipomea batata*): (A) Conformación helicoidal con las 4 hélices en el centro; (B) Coordinación de los centros Cu A y Cu B con los residuos de histidina (Adaptado de Klabunde *et al.*, 1998).

Aunque Klabunde *et al.* (1998) proponen un mecanismo un poco diferente, el modelo presentado por Lee y Whitaker (1995) (Figura 4) es un modelo general, capaz de explicar las actividades catecolasa y creseolasa de la PFO de muchos vegetales y frutas. Éste modelo explica la existencia de tres formas enzimáticas (*met*, *oxi* y *deoxi*) y las particularidades de cada actividad de la enzima (Sellés-Marchat, 2007).

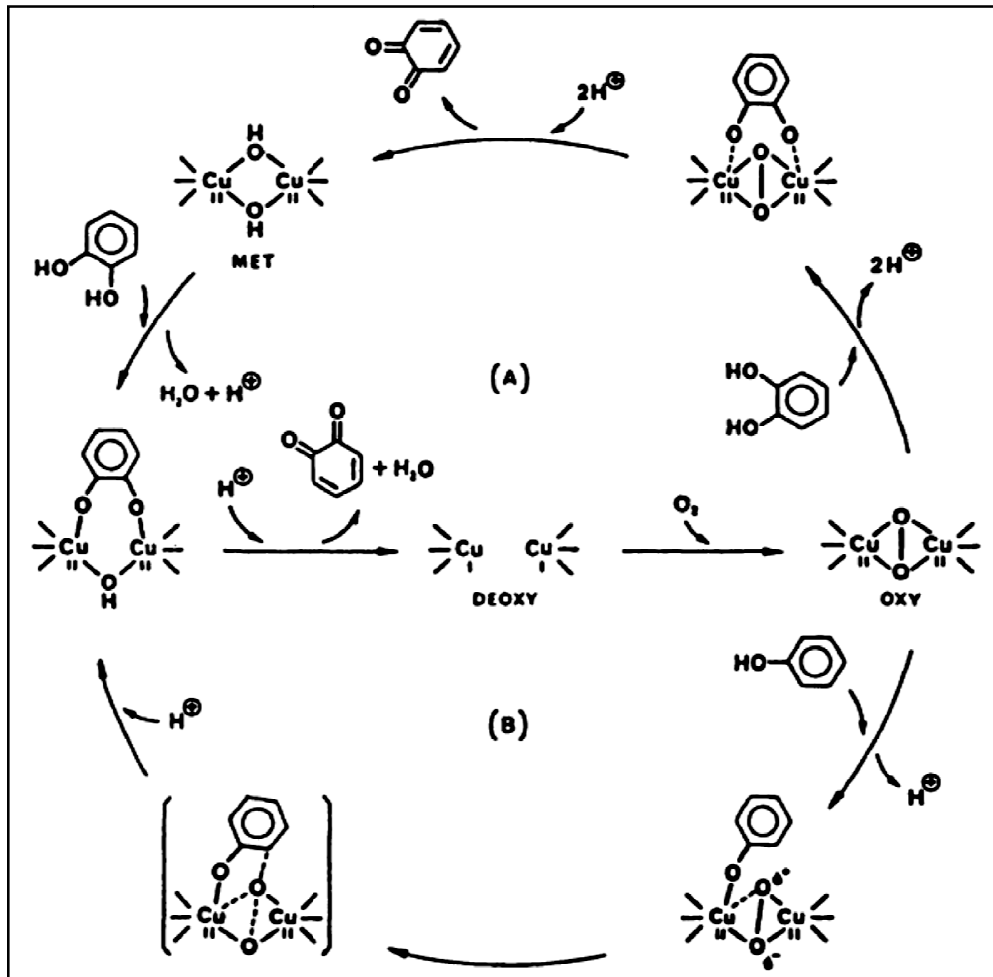


Figura 4: Propuesta cinética que presenta los mecanismos de oxidación de o-difenoles (catecol [A]) y monofenoles (fenol [B]) por la polifenoloxidasasa de la *Neurospora Crassa*. (Adaptado de Lee y Whitaker, 1995).

Las tres formas enzimáticas participan en el ciclo catecolasa (A). En este ciclo un o-difenol reduce al Cu(II) de la forma *met* produciendo la forma *deoxi*Cu(I), en este paso están implicados dos electrones; además, se forma una molécula o-benzoquinona y dos moléculas de agua. A continuación la forma *deoxi* reacciona con el oxígeno molecular generando la forma *oxi*. Cada uno de los átomos de Cu(II) de la forma *oxi* se une a un

átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo de otro *o*-difenoil dando lugar al complejo ternario Cu(II)-O₂-difenoil. En el último paso, el *o*-difenoil es oxidado a *o*-benzoquinona y la enzima es reducida a la forma *met*. Para completar el ciclo, otra molécula de *o*-difenoil se une a la forma *met* y se produce nuevamente la oxidación del *o*-difenoil a *o*-quinona y la correspondiente reducción de la forma *met* a la forma *deoxi* (Ramírez y Whitaker, 2003; Sellés-Marchat, 2007).

En el ciclo creseolasa (B) sólo participan las formas *deoxi* y *oxi*. En este ciclo la forma *oxi* reacciona con un sustrato monofenólico para formar un complejo ternario Cu(II)-O₂-monofenol que se reorganiza para dar lugar a un intermediario de reacción, este intermediario de reacción es de naturaleza muy reactiva y conduce a la hidroxilación del sustrato formándose un *o*-difenoil unido a la enzima. La salida del producto implica la transferencia de 1 e⁻ a cada Cu²⁺, pasando estos a Cu¹⁺ y formándose *o*-quinona, agua y la forma *desoxi* (Ramírez y Whitaker, 2003; Sellés-Marchat, 2007).

La forma *met*, reducida a la forma *deoxi* por un *o*-difenoil también puede ser reducida a la forma *deoxi* por otro compuesto reductor (ácido ascórbico, hidroxilamina, ditionita) y por H₂O₂ en presencia de O₂ (Ramírez y Whitaker, 2003).

El grado de oscurecimiento que sufren las frutas y vegetales frescos cortados puede depender de la concentración y tipos de compuestos fenólicos presentes en los frutos, actividad de la PFO, estado de madurez, presencia de oxígeno, y compartimentación de las enzimas y sus sustratos (Rojas-Graü, 2006).

El oscurecimiento enzimático es la causa principal del deterioro en el aspecto y el valor nutricional en frutas y vegetales, diversas investigaciones se han realizado con el fin de mantener el aspecto y la calidad de estos alimentos, entre ellos, sustancias, películas o métodos que inhiben la actividad polifenoloxidasa de las frutas y vegetales frescos cortados.

1.7 Inhibidores del oscurecimiento enzimático

Uno de los objetivos principales de la industria alimentaria es prevenir el oscurecimiento enzimático antes o durante el procesamiento de frutos y vegetales. El

control de este fenómeno requiere el conocimiento químico del tipo de sustratos fenólicos presentes en cada planta, del nivel de compuestos reductores, el nivel de accesibilidad del O₂, la naturaleza de los diferentes compuestos oxidables y la polimerización y degradación de las *o*-quinonas. Además, es necesario conocer el nivel de PFO y los sustratos disponibles a lo largo de los diferentes estados de desarrollo de la planta y sobre todo, es importante distinguir entre el oscurecimiento enzimático y no enzimático (reacciones de Maillard) (Whitaker y Lee, 1995).

El oscurecimiento enzimático ha sido controlado a través de métodos físicos y químicos (Tabla 5) y en muchos casos ambos son empleados (García y Barrett, 2003).

Tabla 4: Procedimientos usados para limitar el oscurecimiento.

<i>Métodos</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Tratamientos</i>
Físicos	Inhibición de la PFO.	Altas y bajas temperaturas, secado.
	Exclusión de oxígeno.	Atmósferas controladas, reducción del oxígeno, películas y recubrimientos comestibles.
	Remoción del oscurecimiento.	Ultrafiltración, clarificación, centrifugación.
Químicos	Inhibidores de la PFO.	NaCl, CaCl ₂ , SO ₂ , disminución del pH, NaOH, compuestos quelantes (EDTA), hormonas (ácido giberélico, etefón), ácido <i>p</i> -cumarico, 4-hexilresorcinol, ácidos dicarboxílicos insaturados, ácido salicilhidroxámico, proteasas.
	Reducción o captura de quinonas.	Ácido ascórbico y sus derivados, glutatión, cisteína, N-acetilcisteína, SO ₂ y metasulfitos, polivinilpirrolidona y ciclodextrinas.
	Modificación de sustratos.	Metilación por O-metiltransferasa, ruptura oxidativa de anillos por protococatechuate-3, 4-dioxigenasa.

Fuente: Wen, 2001.

1.7.1 Métodos químicos

Varios compuestos químicos son usados para controlar el oscurecimiento enzimático en las frutas y verduras. Algunos son directamente inhibidores de la PFO, otros hacen un medio inadecuado para el desarrollo de la reacción, y otros reaccionan con los reactivos o productos de la PFO de manera que no se puedan producir los pigmentos oscuros (García y Barrett, 2003).

a) Agentes quelantes

Debido a que la PFO es una metaloenzima que contiene cobre en su sitio activo, los agentes quelantes interactúan con su grupo prostético y pueden inhibir la actividad PFO (García y Barrett, 2002; Sapers *et al.*, 1989). Los agentes quelantes como son la cianida, dietilditiocarbamato, salicilaldoxime y derivados de la tiourea como feniltiourea actúan sobre el cobre de la enzima. Otros quelantes de iones metálicos con baja especificidad por el cobre como son la azida de sodio y el EDTA en algunos casos inhiben a la enzima; además, el cobre de la PFO en ocasiones es inaccesible para estos compuestos (Mayer y Harel, 1971). El Sporix es un potente agente quelante; también, es un acidificante y en combinación con ácido ascórbico mostró una efectividad excepcional sobre el oscurecimiento en jugo y rodajas de manzana (Sapers *et al.*, 1989).

b) Acidulantes

Mientras que el pH de reacción se reportó como neutro para la mayoría de las frutas y verduras, el pH óptimo de la PFO se observa en el rango de 6-6.5, a pH de 4 muestra poca actividad, también se ha informado que en un pH por debajo de 3.0 se produce una inactivación irreversible (García y Barrett, 2002). En la mayoría de los casos resulta poco práctico llegar a estas condiciones puesto que esta acción trae consigo un deterioro en las propiedades sensoriales y en la estabilidad del alimento (Badui, 1990). Los acidulantes frecuentemente se ocupan en combinación con otro tipo de agente anti-oscurecimiento, porque es difícil llevar a cabo el control del oscurecimiento únicamente con la reducción del pH. El acidulante más utilizado es el ácido cítrico (García y Barrett, 2002).

c) Agentes reductores

Este tipo de agente anti-oscurecimiento causa la reducción química de las *o*-quinonas resultado de la reacción de oxidación de los *o*-difenoles provocado por la PFO.

Los reductores se oxidan irreversiblemente, lo que significa que el efecto sólo es temporal porque se consumen en la reacción. Cuando los agentes reductores son oxidados las *o*-difenoles pueden sufrir una vez más una reacción de oxidación, finalmente una rápida polimerización lo que provoca pigmentos marrones (García y Barrett, 2002).

El ácido ascórbico, bisulfito de sodio y compuestos tiol retardan o previenen el oscurecimiento inicial de los alimentos (Figura 5). Muchos trabajos consideran que los efectos observados de estos compuestos son debido a la rápida reducción no enzimática de las quinonas a *o*-dihidroxfenoles incoloros; además, que tienen un efecto directo en la inactivación de la PFO (Osuga y Whitaker, 1995).

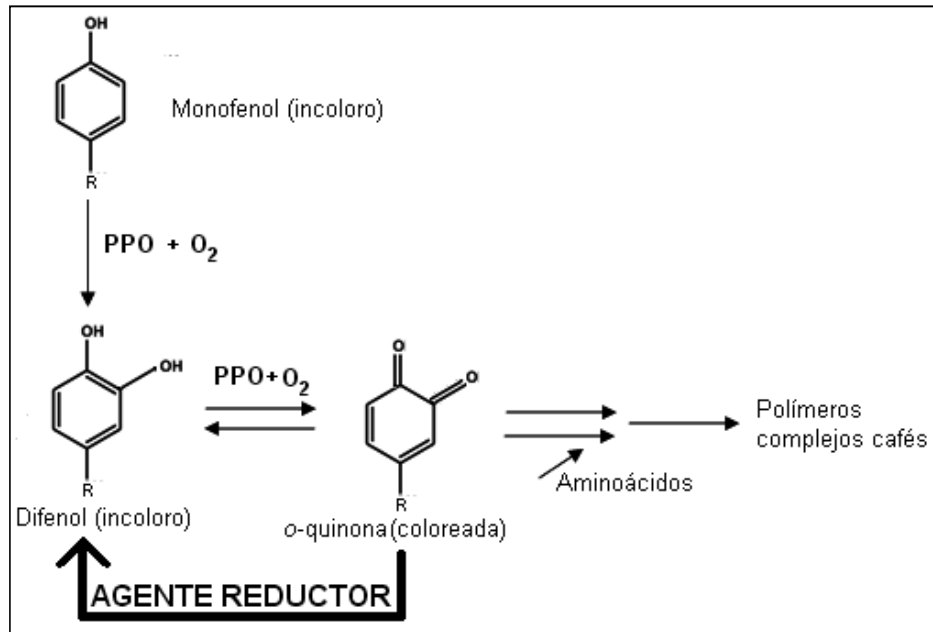
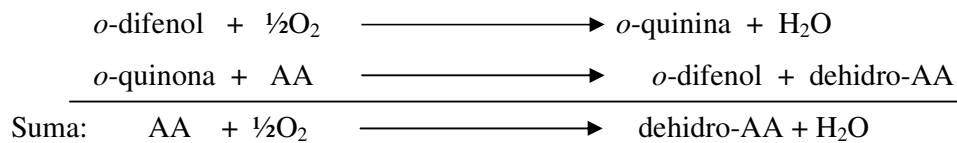


Figura 5: Mecanismo de acción de los compuestos reductores (Adaptado de Lambrecht, 1995).

El ácido ascórbico es el agente más utilizado debido a que produce la disminución del pH; además, que posee propiedades reductoras. El modo de acción del ácido ascórbico sobre la actividad PFO se cree que es de la siguiente forma (Eskin *et al.*, 1971; Robb, 1995):



d) Sulfitos

Los sulfitos se pueden emplear como inhibidores de las reacciones de oscurecimiento, tanto enzimático como no enzimático, al igual como antioxidantes, blanqueadores y antimicrobianos. En este grupo de compuestos se incluyen el anhídrido sulfuroso, sulfitos, bisulfitos y los metasulfitos. Es posible que el mecanismo de acción de estos compuestos se deba a que establecen un complejo quinona-sulfato formando estructuras incoloras; además, evita que las quinonas se polimericen o bien, actúan directamente sobre la enzima y alteran su estructura proteínica (Badui, 1990). Aunque los sulfitos son compuestos muy versátiles, su uso en alimentos está restringido debido a que las personas asmáticas son sensibles a estos compuestos; sin embargo, en alimentos con concentraciones por debajo de 10 ppm no se han asociado con la producción de reacciones provocadas por los sulfitos (Simon e Ishiwata, 2003).

1.7.2 Métodos físicos

Los métodos físicos incluyen la inactivación PFO con temperatura, disminución de oxígeno con el uso de envasado en atmósferas modificadas, recubrimientos comestibles entre otros.

a) Tratamientos térmicos

Tradicionalmente en la elaboración de alimentos convencionales se logra la prevención del oscurecimiento mediante la inactivación térmica de la enzima polifenoloxidasa mediante blanqueado o cocción (García y Barrett, 2003). Los principales efectos de los tratamientos térmicos son: la pérdida de aspecto fresco, destrucción de las vías respiración que sirven de energía para la vida de la célula, y el cambio irreversible de algunos componentes tales como la coagulación de algunas proteínas, desecación del almidón, se suaviza la textura, la formación de compuestos aromáticos y la pérdida de vitaminas y minerales. Lo deseable o indeseable de los efectos de los tratamientos térmicos depende del tiempo de exposición y de la temperatura (Balla y Farkas, 2006). En cambio, una reducción en la temperatura de 10°C produce un descenso similar en la tasa de reacciones catalizadas por enzimas. Este efecto se atribuye a la disminución de la movilidad y de la “colisión efectiva” necesaria para la formación del complejo enzima-sustrato y sus productos (Lozano, 2006).

b) Atmosferas modificadas

El envasado en atmósferas modificadas puede ser definido como una alteración en la composición de los gases en los alrededores del producto fresco, por la respiración y transpiración, cuando dichos productos se sellan en películas plásticas (Thompson, 2003). Esta forma involucra la remoción del aire dentro del empaque y es remplazado con un único gas o mezcla de gases, la mezcla es dependiente del tipo de producto. La atmósfera gaseosa continuamente cambia a lo largo del periodo de almacenamiento debido a factores como son: la respiración del producto empaquetado, los cambios bioquímicos y la permeación de los gases a través del contenedor (Blakistone, 1999). En los frutos las atmósferas modificadas retardan la senescencia, disminuyen la tasa respiratoria y el reblandecimiento de los tejidos; además, reducen la acumulación de microorganismos durante el almacenamiento. El oscurecimiento enzimático es controlado debido a la disminución del oxígeno dentro del empaque, no obstante, los bajos niveles de O₂ y altos niveles de CO₂ pueden inducir la respiración anaeróbica, resultando en la producción de etanol, acetaldehído y acetato de etilo lo que provoca el desarrollo de malos olores y sabores (García y Barrett, 2003); también, pueden formar una atmósfera adecuada para el *Clostridium botulinium* (Luo y Barbosa-Canóvas). Los estudios indican que al sacar el producto del empaque es altamente susceptible al oscurecimiento enzimático debido a la difusión de O₂ en los tejidos y la activación de la PFO (Thompson, 2003).

c) Recubrimientos comestibles

Tradicionalmente los recubrimientos comestibles han sido usados en la industria de los frescos cortados como una estrategia para reducir los efectos nocivos que imponen los procesos mínimos en el tejido intacto (Rojas-Graü, 2009). Las capas delgadas son aplicadas sobre las superficies expuestas de las frutas o vegetales como un remplazo de los tejidos protectivos naturales (García y Barrett, 2002; Pavlath y Orts, 2009).

Pavlath y Orts (2009), definieron a las películas y recubrimientos comestibles como: “cualquier tipo de material usado para envolver diferentes alimentos con el fin de extender su vida útil; además, se pueda comer junto con el alimento”. Una película o recubrimiento puede también proveer una superficie estéril y prevenir la pérdida de otros componentes importantes. Generalmente su espesor es menor a 0.3 mm.

Los recubrimientos comestibles pueden contribuir a extender la vida útil de las frutas frescas cortadas ya que proporcionan una barrera para el movimiento de la humedad, la migración de solutos, el intercambio de gases, la respiración, las tasas de reacción oxidativas y protegen al alimento contra daños mecánicos. Los recubrimientos tienen un mínimo efecto en la calidad nutricional de los alimentos, excepto cuando algunos ingredientes son adicionados al recubrimiento (Fellows, 2000; García y Barrett, 2002; Pavlath y Orts, 2009; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Los recubrimientos son capaces de producir una atmósfera modificada en la fruta, aislando al producto del ambiente. Los recubrimientos con permeabilidad selectiva a los gases son capaces de disminuir el intercambio de O₂ y CO₂, alentando el metabolismo por el decremento interno de O₂ y el incremento de CO₂. Altas concentraciones de CO₂ dentro del tejido de la fruta también retarda la maduración por la disminución de la síntesis de etileno, hormona esencial para la maduración. Se ha demostrado que la respiración de rebanadas de manzana disminuye 20% cuando el fruto es recubierto con una película a base de proteína de suero y que la tasa de evolución de etileno decrece 90% cuando las rebanadas de manzana son recubiertas con una doble capa de polisacárido/lípido (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005). Por lo tanto, el oscurecimiento enzimático es controlado de forma similar que la aplicación de atmósferas modificadas debido a que el recubrimiento puede actuar como una membrana selectiva y disminuir la concentración de O₂ y CO₂ dentro de los tejidos.

La apropiada selección del recubrimiento es importante debido a la naturaleza hidrofílica de las superficies cortadas y de muchos productos frescos cortados. Algunos recubrimientos pueden no adherirse a tales superficies, otros pueden ofrecer buena adherencia pero son barreras muy pobres a la humedad o no resisten la difusión del vapor de agua. Los recubrimientos a base de emulsiones contienen algunos componentes mezclados que al parecer tienen un mejor rendimiento (García y Barrett, 2002).

Los recubrimientos pueden llevar otros aditivos. Agentes antimicrobianos y antifúngicos que protegen a las frutas frescas cortadas contra el crecimiento de microorganismos, agentes antioscurecimiento para retardar el oscurecimiento enzimático en las superficies cortadas, cloruro de calcio en la formulación del recubrimiento mejora

las propiedades texturales; también, pueden ser adicionados nutraceuticos como vitaminas para generar alimentos más saludables (Fellows, 2000; Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Una nueva generación de recubrimientos comestibles está bajo desarrollo con el objetivo de permitir la incorporación y/o la liberación controlada de los compuestos activos usando soluciones nanotecnológicas como son la nanoencapsulación y los sistemas multicapas. Los nanorecubrimientos se elaboran con ingredientes totalmente grado alimenticio (proteínas, polisacáridos, lípidos) y pueden incluir varios agentes funcionales como son antimicrobianos, agentes antioscurecimiento, antioxidantes, enzimas, aromas, colorantes y nutraceuticos (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

1.8 Nanotecnología

La demanda de los consumidores de alimentos frescos y saludables ha llevado a los investigadores a aplicar novedosas tecnologías para producir alimentos de alto valor nutritivo y con atributos sensoriales frescos. Las tecnologías tradicionales de preservación afectan la apariencia, las características sensoriales y el valor nutricional (Balla y Farkas, 2006).

La nanotecnología es la manipulación de la materia en pequeñísima escala a nivel de átomos y moléculas, la cual se está convirtiendo en la base de una revolución industrial de escala mundial y de alcance a muchas ramas de la actividad económica. La Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos define: “Nanotecnología es la manera en que los descubrimientos en la nanoescala son puestos a trabajar, requiere la habilidad de manipular y controlar esos materiales de forma útil” (Foladori e Invernizzi, 2007).

Actualmente muchas definiciones indican que el tamaño de las nanopartículas y los nanocompuestos debe de ser inferior a los 100 nm, donde es más probable que las propiedades de los materiales cambien. Sin embargo, esto no quiere decir que dichos fenómenos no ocurrirán con tamaños por encima de los 100 nm (Chaudhry *et al.*, 2010). Por lo tanto, las nanopartículas son definidas como partículas sólidas o coloidales que incluyen nanoesferas y nanocápsulas, donde la característica fundamental es su tamaño,

que generalmente se da alrededor de 5-10 nm hasta un tamaño límite de 1000 nm, el tamaño generalmente obtenido es de 100 a 500 nm (Quintanar *et al.*, 1998a).

La diferencia entre las nanocápsulas y las nanoesferas radica en que las primeras (Figura 6 (a)), están compuestas por un núcleo aceitoso rodeado por una membrana polimérica, mientras que las nanoesferas (Figura 6 (b)), son formadas por una densa matriz polimérica (Quintanar *et al.*, 1998a).

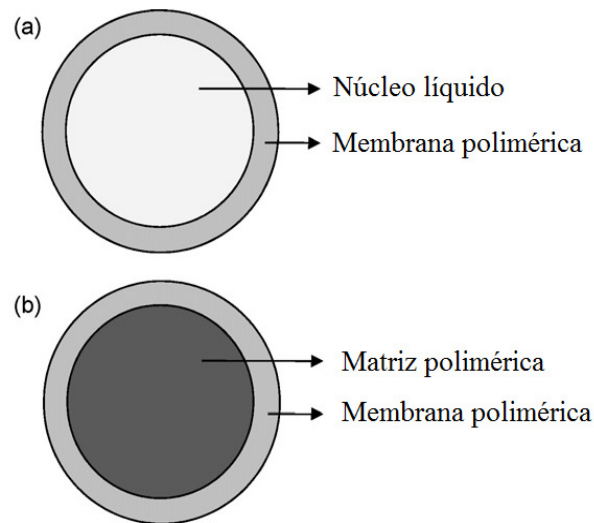


Figura 6: Características de las nanopartículas. Nanocápsulas (a); Nanoesferas (b). (Adaptado de Mora-Huertas *et al.* 2010).

Debido a su pequeña escala, las nanopartículas poseen una inmensa área superficial por unidad de volumen, una alta proporción de átomos en la superficie y cerca de las capas superficiales y la habilidad de exhibir efectos cuánticos (Nagarajan, 2008). Estas cualidades ofrecen grandes ventajas en diferentes áreas de la ciencia, tecnología, ingeniería, bioquímica, tecnología de la información y medicina (Gross, 1999). Al igual que en otras áreas, la nanotecnología promete revolucionar toda la cadena alimentaria, desde la producción, procesamiento, almacenamiento y el desarrollo de materiales innovadores, productos y aplicaciones (FAO/WHO, 2009).

Se han identificado cuatro tipos principales de aplicaciones de la nanotecnología sobre los alimentos: 1) agricultura, 2) procesamiento de alimentos, 3) envases o empaques alimenticios y 4) suplementos alimenticios, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 6

(Pray y Yaktine, 2009). Los principales enfoques de desarrollo han sido hasta ahora la innovación de empaques para alimentos, los ingredientes o aditivos en nanoescala o nanoencapsulados, y los nanotransportadores para la liberación de nutrientes y suplementos alimenticios (Chaudhry *et al.*, 2010).

Tabla 5: Ejemplos de los diferentes usos de la nanotecnología en los alimentos.

<i>Agricultura</i>	<i>Procesamiento de Alimentos</i>	<i>Empaques</i>	<i>Suplementos</i>
La nanotecnología permitió la determinación de moléculas para la determinación de la relación enzima-sustrato.	Nanocápsulas para mejorar la bio-habilidad de nutraceuticos en ingredientes estándar tales como aceites de cocina.	Nanoarcillas y nanopelículas como materiales barrera para prevenir el deterioro y la absorción de oxígeno.	Polvos nanométricos para aumentar la absorción de nutrientes.
Nanocápsulas para la liberación controlada de pesticidas, fertilizantes y otros agroquímicos más eficientemente.	Nanoencapsulados para potenciadores de sabores.	Nanosensores biodegradables para el monitoreo de la temperatura, humedad y tiempo.	Compuestos de nanocristales de celulosa como acarreadores de fármacos.
Nanosensores para detectar patógenos de animales y plantas.	Nanoemulsiones y nanopartículas para mejorar la disponibilidad y dispersión de los nutrientes.	Recubrimientos superficiales de nanopartículas conteniendo agentes antimicrobianos y antifúngicos.	Aerosoles de vitaminas que dispersen nanogotas para mejorar la absorción.

Fuente: Pray y Yaktine, 2009.

La adición de los nanocompuestos sobre moléculas alimenticias, pueden conducir a la modificación de muchas características en macro escala, como es la textura, el sabor, otros atributos sensoriales, la procesabilidad y su estabilidad durante su vida útil (Huang *et al.*, 2010).

Un sistema de liberación para alimentos debe realizar diferentes papeles: 1) debe de servir como medio para encapsular compuestos bioactivos dentro de una forma física que pueda ser incorporado en alimento, 2) el sistema de liberación debe ser compatible con un alimento o bebida al cual sea incorporado, no debe afectar el sabor, la textura o la vida útil

del alimento, 3) debe ser capaz de controlar la liberación del agente funcional a una cierta velocidad, en un sitio particular y/o en respuesta a un estímulo ambiental (pH, fuerza iónica, o temperatura) y 4) deben ser preparados usando ingredientes grado alimenticio, y el proceso utilizado debe ser rentable y práctico (McClements *et al.*, 2007).

1.8.1 Métodos de obtención de nanopartículas y nanodisperiones

Dos estrategias de formación se utilizan actualmente en la nanotecnología: el primer enfoque *top-down* (arriba hacia abajo) y el segundo *bottom-up* (de abajo hacia arriba). Actualmente la producción de nanomateriales a escala comercial involucra el método *top-down*, donde los nanocompuestos son obtenidos mediante la reducción de tamaño de una masa por el uso de molienda, nanolitografía, ingeniería de precisión etc. Y la segunda se refiere a que la nanoestructura se construye a partir de átomos individuales o moléculas capaces de hacer un automontaje, este mecanismo se basa en el equilibrio de atracción y repulsión entre las fuerzas de un par de moléculas, como bloques de construcción para formar estructuras supramoleculares más funcionales (Azeredo, 2009).

Existen diferentes métodos que se han propuesto para formar nanocápsulas a partir de polímeros preformados. De acuerdo con Mora-Huertas *et al.* (2010), hay seis métodos para la preparación de nanocápsulas: desplazamiento de solvente, emulsión-difusión, doble emulsificación, emulsión coacervación, recubrimiento de polímero y capa por capa. Sin embargo, los más utilizados y de sencillo escalamiento se presentan a continuación.

a) Emulsión-evaporación

El polímero preformado y el compuesto activo son disueltos en un solvente orgánico insoluble en agua, que es emulsificado en una solución acuosa. Esta emulsión cruda es expuesta a una fuente de alta energía como son dispositivos ultrasónicos o es pasada a través de homogeneizadores, molinos coloidales o microfluidizadores, con el fin de disminuir el tamaño del glóbulo. La posterior eliminación del solvente orgánico, por calentamiento, vacío o ambos, resulta en la formación de una dispersión fina acuosa de nanoesferas. El paso de homogeneización es el factor determinante en la obtención de las partículas submicrónicas (Quintanar, 1998a). Por otra parte, Mora-Huertas *et al.* (2010) indican que la presencia de compuestos con alto peso molecular dificulta la difusión del solvente y cuando es eliminado durante la etapa de evaporación, hace que la formación de

las nanocápsulas se dificulte, debido a la tensión mecánica causada por las burbujas formadas dentro de la suspensión acuosa.

b) Desplazamiento de solvente

En este proceso, el polímero, el compuesto activo y opcionalmente un estabilizante lipofílico son disueltos en un solvente semipolar miscible en agua, como acetona o etanol. Esta solución es posteriormente inyectada dentro de una solución acuosa conteniendo un estabilizante bajo agitación magnética. Las nanopartículas son formadas instantáneamente por la difusión del solvente que es eliminado de la suspensión bajo reducida presión. El uso de esta técnica es limitada a solventes miscibles en agua, a pesar de esto, algunos solventes producen una cierta inestabilidad cuando son mezclados con el agua (Quintanar *et al.*, 1998a). Con este método se obtienen partículas de tamaño entre 150-200 nm en escala laboratorio (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

c) Salting-out

Este método se basa en la separación de un solvente miscible en agua de una solución acuosa vía un efecto salino. La acetona es generalmente elegida como el solvente miscible en agua, debido a que sus propiedades de solubilización y su separación de soluciones acuosas mediante sales electrolíticas son bien conocidas. El polímero y la sustancia activa son ambos disueltos en acetona y esta solución es emulsificada con una fuerte agitación mecánica en un gel acuoso conteniendo el agente salino y un estabilizador coloidal. Esta emulsión aceite en agua es diluida con un volumen suficiente de agua o soluciones acuosas con el fin de permitir la difusión de la acetona dentro de la fase acuosa, esto induce la formación de las nanoesferas. El solvente es eliminado por filtración (Quintanar *et al.*, 1998a).

d) Emulsión-difusión

La preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión requiere tres fases: la orgánica, acuosa y la dilución (Mora-Huertas *et al.*, 2010). La técnica consiste en emulsificar una solución orgánica conteniendo un aceite, un polímero y el compuesto activo en una solución acuosa con un agente estabilizante. La subsecuente adición de agua al sistema induce la difusión del solvente dentro de la fase externa, resultando en la formación de partículas coloidales (Quintanar *et al.*, 1998b). Para la preparación de estas

nanocápsulas, la fase orgánica es emulsificada bajo vigorosa agitación en la fase acuosa. El exceso de solvente después de la formación de las nanocápsulas puede ser eliminado por destilación o por filtración dependiendo del punto de ebullición del solvente. Se ha demostrado que el tamaño de las nanopartículas está relacionado con la velocidad de cizalla usada en el proceso de emulsificación, de la composición de la fase orgánica, la concentración del polímero, de la relación polímero-aceite, y del tamaño de las gotas de la emulsión primaria. El tamaño de las nanocápsulas generadas por este método varía entre 150-200 nm (Mora-Huertas *et al.*, 2010)

Los polímeros comúnmente usados para la formación de nanocápsulas son los poliésteres biodegradables, especialmente, poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli(lactido) (PLA) y poli(lactido-co-glicolido) (PLGA) y poli(alquilocianoacrilato) (PACA). Eudragit[®] también puede ser usado como muchos otros polímeros. Los polímeros sintéticos tienen mayor pureza y mejor reproducibilidad que los polímeros naturales (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

e) Nanoemulsiones

Los coloides de asociación como micelas, vesículas, bicapas, micelas inversas y cristales líquidos han sido usados por muchos años para encapsular y liberar ingredientes funcionales polares, no polares o anfifílicos. La mayor ventaja de estos sistemas son su formación, son termodinámicamente favorables, y son típicamente soluciones transparentes. La mayor desventaja que poseen estas estructuras, son las grandes cantidades de surfactantes requeridas para su formación que puede producir problemas en sabores, costos o legalidad (Weiss *et al.*, 2006). Las nanoemulsiones, siendo sistemas no equilibrados, no se pueden formar espontáneamente; consecuentemente, se necesita energía para formarlas con el uso de dispositivos mecánicos o por potenciales químicos. La formación de nanoemulsiones por dispersión o también llamado dispersión o emulsificación de alta energía, generalmente se logran mediante dispositivos de alto cizallamiento, homogeneizadores de alta presión y generadores ultrasónicos. Los homogeneizadores de alta presión son los instrumentos mayormente utilizados para la formación de nanoemulsiones. Generalmente trabajan en un rango de presiones entre 50 y 100 MPa (Solans *et al.*, 2005). Estos dispositivos pueden formar emulsiones con diámetros de gotas menores de 100 nm a 500 nm (Weiss *et al.*, 2006).

1.8.2 Caracterización de los sistemas coloidales

La estabilidad de los sistemas dispersos se refiere a la capacidad del sistema en resistir cambios en sus propiedades a través del tiempo. En los sistemas más estables, sus propiedades cambian más lentamente. Un sistema disperso puede ser inestable debido a diferentes tipos de procesos tanto físicos como químicos produciendo fenómenos como cremado, floculación, coalescencia, oxidación o hidrólisis. La medición de diferentes parámetros en los sistemas como el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta pueden indicar si un sistema disperso es o no estable (McClements, 1999).

a) Tamaño de partícula e Índice de polidispersión.

El conocimiento del tamaño de partícula y la distribución de su tamaño, es importante para la caracterización de la calidad y estabilidad de una amplia variedad de sistemas particulados (Karlsson *et al.*, 2005). Estos parámetros proveen información de la eficiencia del proceso de emulsificación, si la emulsión es inestable la distribución del tamaño de partícula cambiará con el tiempo (Dalglish, 2004).

Aproximadamente 400 métodos para el análisis del tamaño de partícula se han reportado (Karlsson *et al.*, 2005). El método más directo y está teóricamente poco sujeto a errores es la microscopía electrónica. Los métodos más ampliamente usados para la medición del tamaño de partícula se basan en dispersión de luz. Estos tienden a enfatizar las partículas grandes en la distribución, debido a que el gran tamaño de estas partículas dispersan más la luz que las partículas pequeñas. Este método es rápido y puede realizarse en cualquier laboratorio que posea un espectrofotómetro, no se puede utilizar para dar la verdadera distribución de tamaños pero se puede obtener un promedio (Dalglish, 2004).

Si todas las gotas o partículas en un sistema disperso son del mismo tamaño, el sistema es referido como monodisperso, pero si hay un rango de tamaños presentes es referido como polidisperso. El tamaño de la partícula en un sistema monodisperso puede ser completamente caracterizado por un número simple, como es el diámetro o el radio de la partícula. Los sistemas monodispersos son algunas veces usados para estudios fundamentales, debido a que su interpretación o medición experimental es mucho más simple que los sistemas polidispersos (McClements, 1999). La monodispersidad del tamaño debe ser respetado por diversas razones, como por ejemplo, para obtener

reproducibilidad en los inmunoensayos usados en diagnóstico, en sistemas de liberación controlada en donde el tamaño de partícula no debe superar un límite para el transporte en los canales de tamaño micrométrico, etc. (Pichot, 2008).

b) Potencial Zeta (ζ)

Los fenómenos electrocinéticos son un término genérico aplicado a los efectos asociados con el movimiento de las soluciones iónicas cerca de las interfaces cargadas. La determinación de la estructura detallada de la doble capa eléctrica de polímeros coloidales son de gran importancia en problemas de estabilidad y reología de sistemas dispersos (Hidalgo-Álvarez, 1996).

Las partículas poliméricas usualmente adquieren una superficie cargada neta. Esto puede deberse a: 1) La desprotonación, de los grupos terminales hidrofílicos en un medio acuoso, como son los grupos $-\text{COOH}$ o $-\text{SO}_3\text{H}$, que migran de la interface polímero-solvente durante la formación de la partícula. 2) La coabsorción de surfactantes iónicos dentro de la periferia de la partícula durante el proceso de polimerización, o su pos-absorción dentro de la superficie de partículas preformadas (Vincent, 2005).

La capa de contra-iones que rodean la partícula cargada es llamada doble capa difusa y la concentración de contra-iones en la doble capa difusa es función de la distancia de la superficie de la partícula. Cuando la partícula cargada se mueve con respecto a su alrededor líquido, hay un plano de corte entre las dos fases y el potencial eléctrico del plano se llama potencial Zeta (Figura 7). Debido a que el potencial zeta determina las fuerzas interpartículas entre sistemas electrostáticamente estabilizados esta es una medida de estabilidad relativa. Cuando los valores son lejanos a cero significa estabilidad y si los valores son aproximados a cero esto significa inestabilidad, que típicamente pueden conducir a floculación o coagulación. La línea divisoria entre suspensiones estables e inestables generalmente se toma en $+30$ mV o -30 mV, las partículas con potencial zeta más positivos o más negativos de dicho rango son normalmente consideradas estables (Malvern Instruments Ltd., 2003). Son usados diversos métodos experimentales para medir el potencial zeta en suspensiones, emulsiones o macromoléculas en solución, estos son técnicas electroforéticas y electroacústicas (Karlsson y Schade, 2005).

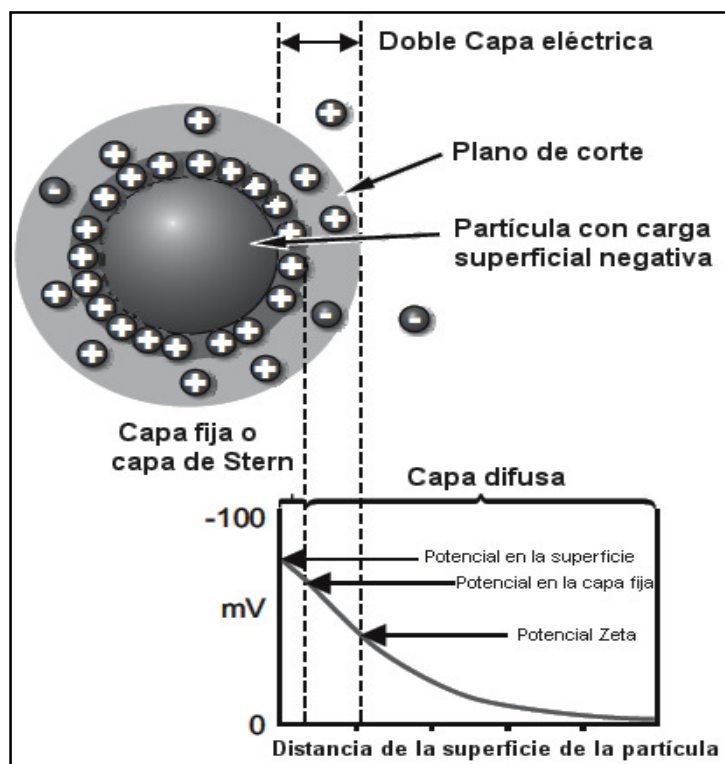


Figura 7: Esquema de la partícula cargada y las cargas que se le unen. (Adaptado de Malvern Instruments Ltd., 2003).

El instrumento más sofisticado para la medición del tamaño de partícula y el potencial zeta es el Zetasizer[®] desarrollado por Malvern Instruments Ltd. Dos haces de luz se hacen intersecar entre sí en una posición particular dentro de una celda de medición de manera que ellas formen un patrón de interferencia que consisten en regiones de alta y baja energía. Las partículas dispersas (por ejemplo, gotas de emulsión) cargadas, se hacen mover a través del patrón de interferencia aplicando un campo eléctrico en la celda. Las gotas se mueven a través del patrón de interferencia, ellas dispersan la luz en las regiones brillantes pero no en las oscuras. Cuanto más rápido se mueva una gota a través del patrón de interferencia, mayor será la frecuencia de la intensidad de las flocculaciones. Por la medida y análisis de la frecuencia de estas flocculaciones, es posible determinar la velocidad de las partículas, que puede ser matemáticamente relacionada con el potencial zeta. El signo de la carga se comprueba mediante la dirección en que se mueven en el campo eléctrico. El mismo instrumento se puede utilizar para determinar la concentración de gotas y la distribución de tamaño (de 10 nm a 3 μm) de una emulsión por una técnica dinámica de dispersión de luz (McClements, 1999).

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de sistemas de talla submicrónica sobre los cambios en la actividad de la polifenoloxidasas y en la concentración de compuestos fenólicos, correlacionándolos con los cambios en el índice de oscurecimiento cuando los sistemas son aplicados sobre la superficie de la manzana 'Red Delicious' fresca cortada y almacenada a 4°C.

2.1.1 Objetivos particulares

1.- Evaluar el efecto de los tratamientos de talla submicrónica respecto a la solución y la emulsión sobre la actividad de la polifenoloxidasas de la manzana 'Red Delicious' fresca cortada durante su almacenamiento a 4°C.

2.- Determinar el efecto de sistemas de talla submicrónica respecto a la emulsión y la solución de α -tocoferol sobre el índice de oscurecimiento para correlacionarlos con la actividad de la polifenoloxidasas en manzana fresca-cortada y refrigerada.

3.- Evaluar los cambios en los fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, como un efecto sobre el índice de oscurecimiento y los cambios en vida útil de manzana 'Red Delicious' fresca-cortada.

2.1.2 Justificación de variables

En la Tabla 6 se muestran las variables utilizadas para determinar el efecto del tamaño de partícula sobre el índice de oscurecimiento, actividad de la polifenoloxidasas y la concentración de los fenoles totales en la superficie cortada de la manzana 'Red Delicious' refrigerada.

Para esta investigación se eligió la manzana *M. domestica* Borkh variedad 'Red Delicious' ya que este tipo de manzana presenta la mayor actividad de la enzima polifenoloxidasas (Wakayama, 1995) y un alto contenido de compuestos fenólicos (Amiot

Tabla 6: Tabla de Variables.

<i>Factor de Variación</i>	<i>Niveles de Variación</i>	<i>No. de Réplicas</i>	<i>Variable de Respuesta</i>	<i>Técnicas de Medición/Análisis</i>
Tratamiento	Control (CaCl ₂)	3	Concentración de fenoles totales	Folin-Ciocalteu (Espectrofotómetro UV-Vis Cintra® 10e).
	Solución de TPGS			
	Emulsión de dl- α -tocoferol con goma xantana		Actividad polifenoloxidasas	Espectrofotometría (Espectrofotómetro UV-Vis Cintra® 10e).
	Nanoemulsión de dl- α -tocoferol con goma xantana			
	Nanocápsulas de dl- α -tocoferol con goma xantana		Índice de oscurecimiento	Colorimetría (Colorímetro Minolta® CR-300).
	Solución de ácido ascórbico			
	Solución de goma xantana			
Sistemas coloidales	Emulsión de dl- α -tocoferol	3	Potencial Zeta	Electroforesis (Zetasizer® 4)
	Nanoemulsión de dl- α -tocoferol		Tamaño de partícula	Dispersión de luz (Zetasizer® 4)
	Nanocápsulas de dl- α -tocoferol		Índice de polidispersión	Dispersión de luz (Zetasizer® 4)
	Emulsión de dl- α -tocoferol con goma xantana		Micrografías en manzanas (sólo los sistemas con xantana)	Microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM 5600 LV SEM)
	Nanoemulsión de dl- α -tocoferol con goma xantana			
	Nanoemulsión de dl- α -tocoferol con goma xantana			
	Nanocápsulas de dl- α -tocoferol con goma xantana			

et al., 1992; Tsao *et al.*, 2003); lo que conlleva a tener un mayor índice de oscurecimiento ya que este factor es dependiente de la actividad de la polifenoloxidasas, la concentración y tipo de compuestos fenólicos, la presencia de oxígeno y el estado de madurez (Rojas-Graü, 2006).

Las manzanas se sometieron a 6 tratamientos diferentes (solución de ácido ascórbico, emulsión de acetato de dl- α -tocoferol, nanoemulsión de acetato de dl- α -tocoferol, nanocápsulas de acetato de dl- α -tocoferol, solución TPGS y goma xantana), en las cuales se determinó la actividad de la polifenoloxidasas, el índice de oscurecimiento y la concentración de compuestos fenólicos en la superficie cortada de las manzanas durante 14 días en refrigeración. Además, se midió el tamaño de partícula en los diferentes sistemas dispersos durante 6 semanas y se tomaron micrografías de los sistemas con goma xantana recubriendo a la manzana. Todo ello para establecer el efecto del tamaño de partícula sobre la actividad de la polifenoloxidasas de la manzana 'Red Delicious' cortada-refrigerada.

2.2 Materiales

2.2.1 Reactivos

D- α -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato (TPGS), catecol, ácido gálico, reactivo de Folin-Ciocalteu, Pluronic[®] F-127 (P-127) y Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Pm~80KDa), fueron proveídos de Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, USA), acetato de dl- α -tocoferol fue adquirido de Alfadelta (Estado de México, México), ácido ascórbico, cloruro de calcio (CaCl₂), polietilenglicol, polisorbato 80 (Tween[®] 80), sorbato de potasio, carbonato de sodio, monoleato de sorbitan (Span[®] 80) y goma xantana fueron adquiridos de Droguería Cosmopolita (Distrito Federal, México), acetato de etilo (AcEt) de Alyt (Distrito Federal, México), alquil aril polieter alcohol (Triton[®] X-100) de J.T. Baker Analyzed[®] (N.J., USA). Agua desionizada y destilada fue purificada usando un sistema Milli-Q[®] (Millipore Corp., Massachusetts, USA).

2.2.2 Material Vegetal

Las manzanas 'Red Delicious' fueron obtenidas en un centro de distribución de frutas del área (Cuautitlan Izcalli, México), se seleccionaron de acuerdo a su color y tamaño (visualmente) en madurez comercial conteniendo 12-14 °Brix y una fuerza de

ruptura por punción de 7 N, fueron almacenadas ($4 \pm 1^\circ\text{C}$, 90-95% H.R.) hasta su uso no más de cinco días.

2.3 Métodos

2.3.1 Caracterización de la cámara de refrigeración

Se utilizó para éste propósito la cámara de refrigeración No. 2 ubicada en la Nave 2000 de Ingeniería en Alimentos. Previamente se sanitizó con una solución de cloruro de benzalconio (150 ppm) para eliminar los microorganismos presentes que pudieran afectar la experimentación. Se determinó la temperatura y la humedad relativa dentro de la cámara con un termopar USB (EL-USB-2, Lascar Electronics, Pensilvania, E.U.). La humedad relativa se controló con un recipiente con agua en el interior de la cámara.

2.3.2 Preparación de los sistemas coloidales.

a) Emulsión

Se realizó mediante el método de emulsificación convencional. La fase dispersa estuvo compuesta por 2g de acetato de dl- α -tocoferol y 42g de surfactante lipofílico (Span[®] 80). La fase continua fue formada por 600 ml de agua desionizada y 8g de surfactante hidrofílico (Tween[®] 80). La solución lipofílica se adicionó a la fase acuosa la cual se mezcló con un agitador de velocidad variable tipo R2R1 (Heidolph[®] Instruments, Schwabach, Alemania) a 2500 rpm. La emulsión obtenida se mezcló con una solución de goma xantana al 0.3% (p/v) conteniendo 0.5% (p/v) de propilenglicol, la solución de xantana se utilizó como soporte de los sistemas coloidales.

b) Nanoemulsión

La nanoemulsión se realizó por el método de emulsificación de alta energía descrito por Solans *et al.* (2005). La emulsión previamente formada se sometió a 5 ciclos de 10 000 rpm con un agitador de alta velocidad (Ultra-Turrax[®] T50, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania), posteriormente se adicionó la solución de xantana, para tener una concentración final de esta de 0.3%.

c) Nanocápsulas

Las nanocápsulas de acetato de dl- α -tocoferol fueron formadas por el método de emulsificación-difusión descrito por Quintanar *et al.* (1998b). AcEt y agua desionizada

fueron saturados manualmente, se dejó reposar hasta alcanzar el equilibrio entre ambos líquidos. Fueron disueltos 0.5 ml de acetato de dl- α -tocoferol y 200 mg de PCL en AcEt saturado con agua, la solución fue emulsificada con agua saturada de AcEt conteniendo 5% (p/v) de P-127, usando un agitador Ultra-Turrax[®] T50 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) a 4000 rpm, 200 ml de agua fueron adicionados para inducir la difusión del solvente en la fase continua dando lugar a la formación de las nanopartículas. El solvente fue eliminado por destilación al vacío a 30°C y 70 mmHg (Laborota 4000 Eco Rotary Evaporator, Heidolph[®] Instruments, Schwabach, Alemania). Las nanopartículas preparadas se mezclaron con la solución de xantana anteriormente mencionada.

2.3.3 Caracterización de los sistemas coloidales

a) Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersión

La distribución del tamaño de partícula e índice de polidispersión de los sistemas coloidales fue determinado mediante la técnica de dispersión de luz laser con un ángulo fijo de 90° usando un Zetasizer[®] 4 (Malvern Ltd., Orsay, France). Las dispersiones fueron diluidas con agua Milli-Q[®], de acuerdo con el histograma de volumen de frecuencia. Las mediciones se realizaron a los sistemas con y sin goma una vez por semana durante seis semanas a 25°C por triplicado.

b) Determinación del potencial zeta (ζ)

El potencial zeta de las dispersiones coloidales preparadas fue medido usando un Zetasizer[®] 4 (Malvern Ltd., Orsay, France) a 25°C, las muestras fueron diluidas con agua desionizada. Los resultados fueron normalizados con respecto a la solución estándar de poliestireno ($\zeta = -55\text{mV}$). Las mediciones se hicieron una vez por semana a los sistemas con y sin goma, por triplicado.

c) Microscopía electrónica de barrido

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Zambrano-Zaragoza *et al.* (2011). Se tomó la superficie recubierta de las manzanas, las muestras fueron montadas en porta muestras y cubiertas en un evaporador catódico con una capa de oro (~20 nm) usando un JFC-1100 Sputter Coater (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido a bajo vacío (JEOL JSM 5600 LV SEM, JEOL Ltd., Tokio, Japón)

con una resolución de 5 nm. Se utilizó un voltaje de aceleración electrónica de 20 kV y una presión de 20 Pa en la cámara de muestra.

2.3.4 Aplicación de los tratamientos

Las manzanas seleccionadas fueron lavadas con hipoclorito de sodio (70 ppm), fueron cortadas de los polos, descorazonadas y partidas (tipo gajo), los utensilios fueron desinfectados con cloruro de benzalconio (150 ppm). Las manzanas cortadas fueron sumergidas en una solución de CaCl₂ al 1% (p/v), después de escurridas fueron inmersas en los diferentes tratamientos: solución 0.5% (p/v) de ácido ascórbico, solución 0.5% (p/v) de TPGS, solución de goma xantana al 0.3% (p/v) y los sistemas coloidales descritos anteriormente, después de escurridas fueron envasadas en vasos de poliestireno rígido (5 trozos de manzana/vaso, 80-90 g de peso) y almacenados a 4 ± 1 °C y 90-95% H.R. durante 14 días. El control sólo fue tratado con CaCl₂.

2.3.5 Determinación del índice de oscurecimiento

El índice de oscurecimiento se determinó mediante la ecuación descrita por Poul *et al.* (1999):

$$IO = \frac{100(x - 0.31)}{0.172}$$

Donde:

$$x = \frac{a^* + 1.75L^*}{5.645L^* + a^* - 3.012b^*}$$

Los parámetros L*, a* y b* se obtuvieron con un colorímetro Minolta® CR-300 (Konica Minolta®, Tokio, Japón) con 8 mm de área de medición e iluminación difusa/0°, sobre la superficie recubierta de las manzanas, el instrumento se estandarizó con un plato de calibración (L* = 97.02, a* = +0.13, b* = +1.77).

2.3.6 Determinación de la actividad de la polifenoloxidasas

La extracción de la enzima PFO se realizó de acuerdo a Murata *et al.* (1992) con algunas modificaciones. La superficie cortada (30 g) fue molida en una licuadora con cantidad suficiente (20 ml) de buffer fosfato de sodio frío 0.2 M pH 7.0 conteniendo 1% (v/v) de Triton® X-100 por 30 segundos. El homogeneizado fue filtrado con la finalidad de

eliminar las partículas sólidas y se centrifugó a 4000 rpm (EBA 8S, HettichLab, Tuttlingen, Alemania) por 35 minutos. El sobrenadante fue el extracto enzimático utilizado en la determinación de la actividad de la polifenoloxidasas. La actividad enzimática fue determinada de acuerdo a la técnica seguida por Zhou *et al.* (1993), donde se midió el incremento en la absorbancia a 420 nm (UV-Vis Cintra 10e, GBC Scientific Equipment Ltd., Dandenong Victoria, Australia), la mezcla de reacción consistió en 0.2 ml de solución enzimática y 2.8 ml de 0.050 M de catecol en 0.1M citrato-fosfato buffer pH 6.5 a 25°C, el blanco contenía únicamente 3.0 ml de solución de sustrato. Los cambios en la absorbancia fueron colectados cada minuto durante 15 minutos. Una unidad de actividad PFO se define como el cambio de 0.001 Abs por minuto, la velocidad de reacción inicial fue estimada de la porción lineal de la curva graficada. Las mediciones se realizaron por triplicado.

2.3.7 Medición de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevo a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999). Previamente se realizó la curva patrón de ácido gálico. Se disolvieron 500 mg de ácido gálico en 10 mililitros de etanol grado HPLC y se adicionó agua destilada hasta completar 100 ml. Se tomaron 1, 2, 3, 5 y 10 ml de la solución anteriormente preparada y se aforaron con agua destilada hasta alcanzar 100 ml. Estas soluciones tuvieron una concentración de fenoles de 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L de ácido gálico respectivamente.

Se vertieron 30 µl de cada solución o de jugo de manzana extraído de la superficie cortada de las manzanas tratadas en tubos de ensayo, se añadieron 2.4 ml de agua destilada y 150 µl de reactivo comercial Folin-Ciocalteu diluido 1:10, entre 30 segundos y 8 minutos se adicionó 450 µl de carbonato de sodios (200 g L⁻¹), se dejó reposar durante una hora y se leyó la absorbancia a 760 nm (UV-Vis Cintra 10e, GBC Scientific Equipment Ltd., Dandenong Victoria, Australia). Para concentraciones mayores a 500 mg/L fue necesario hacer una dilución (1:2) debido a que la saturación de fenoles no permitía las lecturas espectrofotométricas. Los resultados de la determinación de los compuestos fenólicos se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (mgEAG) por gramo. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4 Análisis estadístico

Se obtuvo la media, desviación estándar y coeficiente de variación de las muestras evaluadas. Para evaluar los cambios en los fenoles totales, la actividad de la polifenoloxidasas y su relación con los cambios de color se llevó a cabo un análisis de bloques completos. Las diferencias entre tratamientos se establecieron mediante un ANOVA con un nivel de significancia de 0.05, para este fin se utilizó el software estadístico Minitab® 15 (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos).

CAPÍTULO III: ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la cámara de refrigeración.

En la Figura 8 se muestra el perfil de temperatura dentro de la cámara de refrigeración, se observa que la temperatura osciló entre 4 y 5 °C. Do Nascimento-Nunes (2008), Herrero y Guardia (1992) y Kader y Barrett (2005), indican que las manzanas pueden ser almacenadas en el rango de 0 a 5 °C dependiendo de su susceptibilidad a los daños por frío, para las variedades susceptibles ('Granny Smith', 'McIntosh' y 'Honeycrisp') es recomendable almacenarlas de 3 a 5 °C y para las que no son susceptibles a los daños por frío ('Red Delicious', 'Golden Delicious', 'Fuji' y 'Gala') pueden almacenarse en un rango de 0 a 2 °C. Aunque la variedad 'Red Delicious' no es susceptible a los daños por frío, en la mayoría de los refrigeradores comerciales la temperatura varía entre 4 y 5 °C, debido a esto la temperatura de almacenamiento elegida para este estudio es la utilizada en refrigeración comercial.

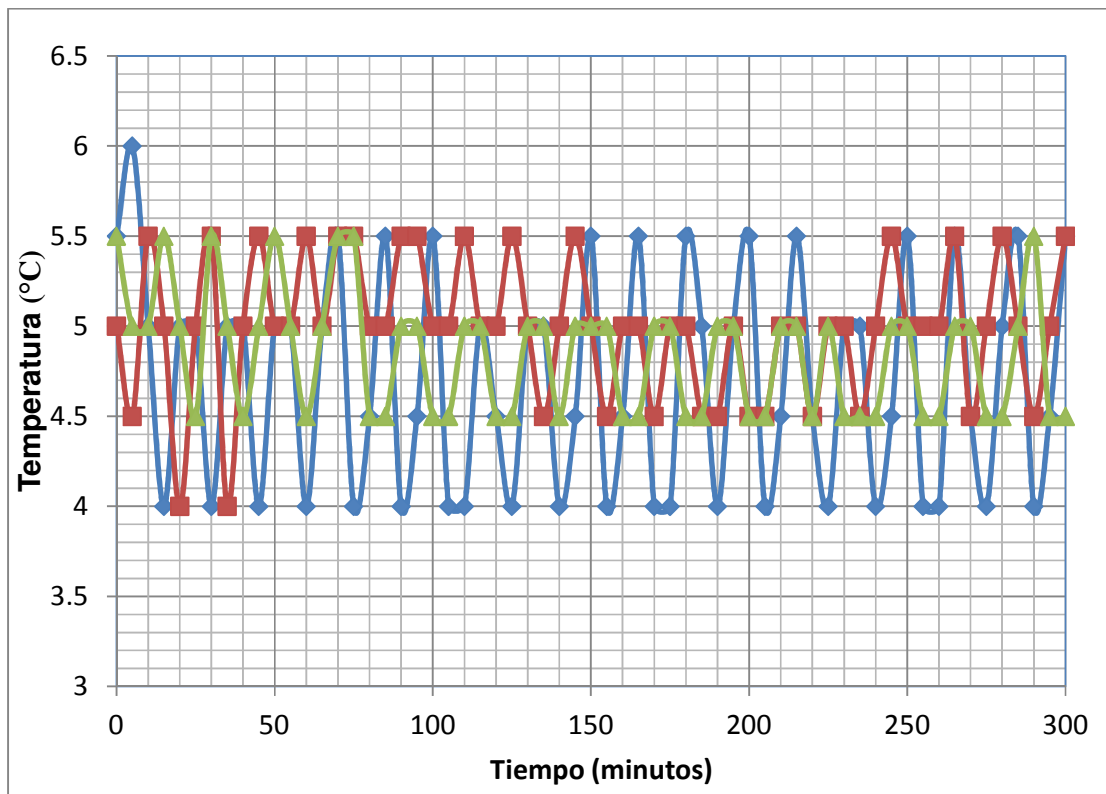


Figura 8: Caracterización térmica de la cámara de refrigeración. —◆— Prueba 1; —■— Prueba 2; —▲— Prueba 3.

La humedad relativa en la cámara (Figura 9) varió entre 90 y 95%. Para el almacenamiento de manzanas se recomienda entre 85 a 95% de humedad relativa (Herrero y Guardia, 1992). Este parámetro en la conservación de frutas frescas cortadas es indispensable debido a que la velocidad de pérdida de agua en frutas depende del déficit de la presión de vapor entre el producto y al aire del ambiente que lo rodea, que es influenciado por la temperatura y la humedad relativa (Kader y Barrett, 2005). Las manzanas tienen aproximadamente 85% de humedad; por lo tanto, cantidades menores en el aire de los alrededores pueden desecar el alimento, ya que se provoca la difusión de agua del fruto hacia el medio, esto produce pérdida de peso y efectos negativos en la calidad.

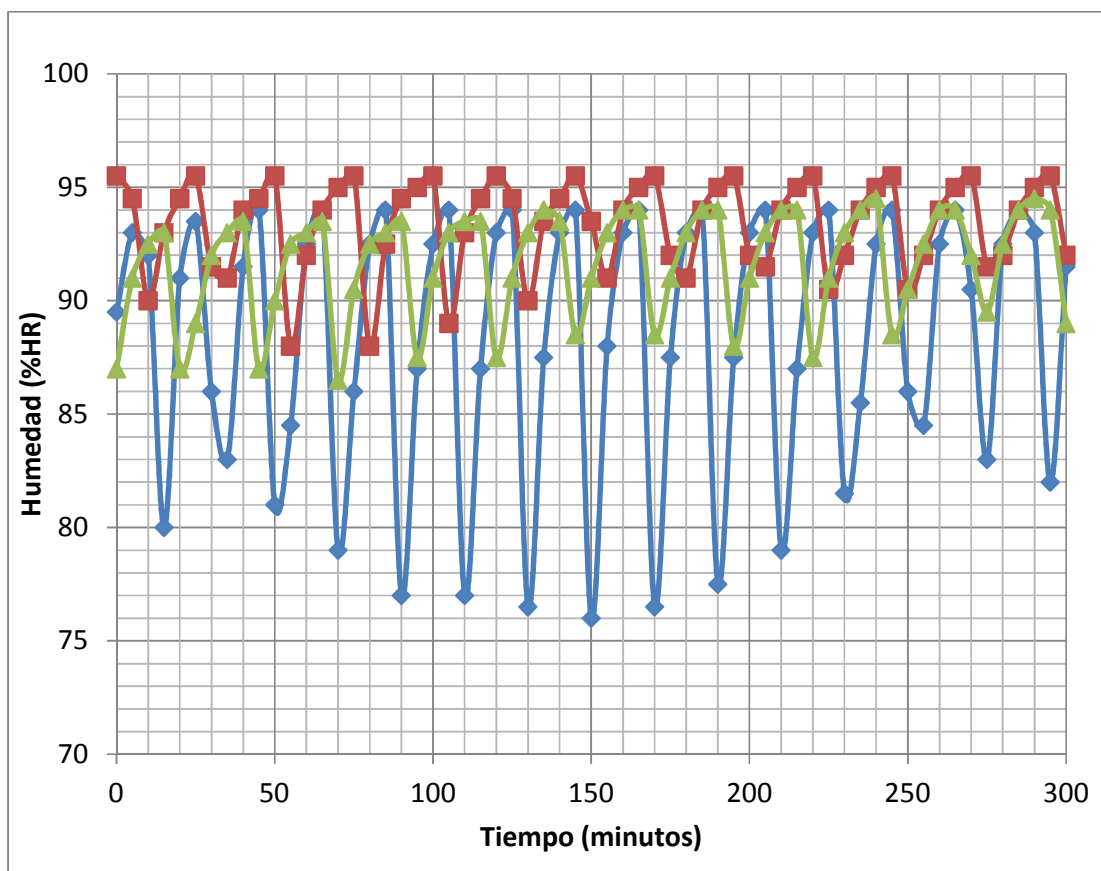


Figura 9: Humedad relativa dentro de la cámara de refrigeración. —◆— Prueba 1; —■— Prueba 2; —▲— Prueba 3

3.2 Estandarización de los métodos de medición

La estandarización de los métodos para la determinación del contenido de polifenoles y actividad polifenoloxidasas es indispensable debido a la necesidad de obtener datos confiables y reproducibles.

3.2.1 Estandarización de la técnica para la determinación de la actividad polifenoloxidasas.

La determinación de la actividad polifenoloxidasas en manzanas ‘Red Delicious’ se llevó a cabo como se describió en materiales y métodos, se midió la conversión de catecol a *o*-benzoquinona que tiene un máximo de absorción a 420 nm.

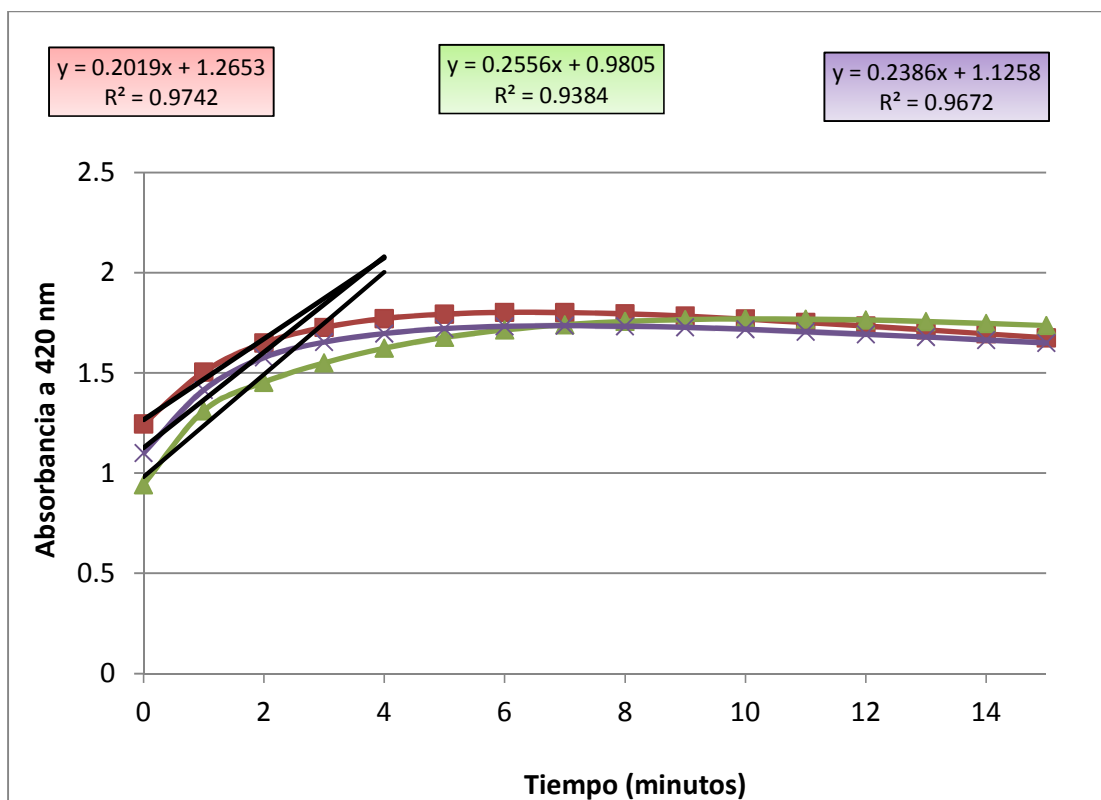


Figura 10: Medición de la transformación del catecol a *o*-benzoquinona. —■— Manzana 1; —▲— Manzana 2; —×— Manzana 3.

La actividad enzimática se determinó conforme a la porción lineal de la curva obtenida en el espectrofotómetro (Figura 10). La pendiente representa la tasa o velocidad de cambio del catecol a *o*-benzoquinona por minuto y el coeficiente de determinación (R^2) el grado de asociación lineal entre el tiempo y la absorbancia. La pendiente obtenida fue tratada de la siguiente manera:

$$\text{Unidades de actividad (U)} = \frac{\text{Pendiente obtenida de la porción lineal de la curva}}{0.001}$$

$$\text{Actividad Relativa } \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{\text{Unidades de actividad}}{\text{ml de enzima utilizada}}$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7: Actividad enzimática PFO de manzanas ‘Red Delicious’ sin tratamiento.

Muestra	Pendiente	Unidades de Actividad (U)	Actividad relativa (U/ml)
Manzana 1	0.201	201	1005
Manzana 2	0.255	255	1275
Manzana 3	0.238	238	1190
		Promedio	1156.66
		D.E.	112.71
		C.V.	9.74

Wakayama (1995), estudió la actividad polifenoloxidasa en la piel, el mesocarpio y endocarpio de 5 variedades de manzana cultivadas en Japón, en las que se encuentra la variedad ‘Red Delicious’, encontrando que esta variedad presenta la mayor actividad de todas las estudiadas con un total de 1570 U/ml, en donde el mesocarpio y el endocarpio juntos muestran una actividad de 1230 U/ml, mientras que en el presente estudio se obtuvo un promedio de 1156.66 ± 112.71 U/ml, existe una diferencia 73.34 U/ml entre éstos resultados y la fuente bibliográfica, posiblemente debido a factores como diferencias en el crecimiento, localización, condiciones agronómicas y ambientales. Como se muestra en la Tabla 9, aunque las manzanas fueron de un mismo lote hubo diferencias entre las muestras ya que se obtuvo un coeficiente de variación relativamente alto (9.74%); sin embargo, este comportamiento es esperado en materiales biológicos.

Por lo tanto, la técnica seguida para la determinación de la actividad polifenoloxidasa en manzanas ‘Red Delicious’ tuvo pocas variaciones con respecto a la

fuentes bibliográficas y se concluye que la técnica es efectiva para ser aplicada sobre las manzanas tratadas.

3.2.2 Estandarización de la técnica Folin-Ciocalteu

Para la estandarización de la técnica y la determinación de los compuestos fenólicos en la superficie tratada de las manzanas, se realizó la curva patrón de ácido gálico como se describió en materiales y métodos. Los resultados de las lecturas espectrofotométricas se muestran en la Figura 11.

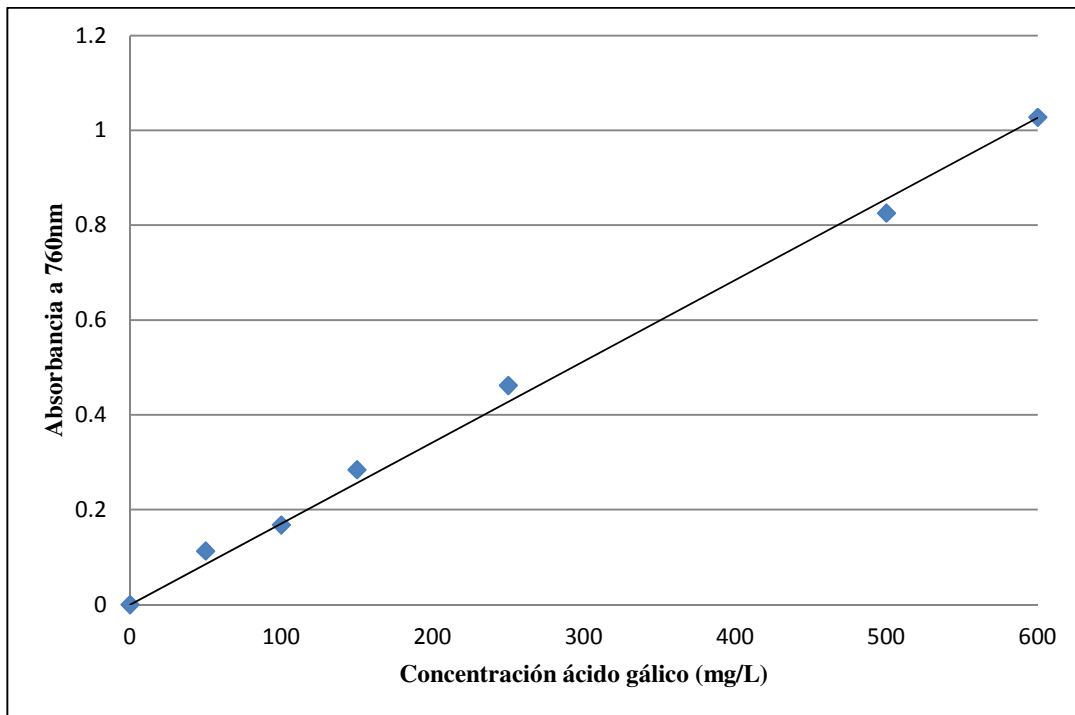


Figura 11: Curva patrón de ácido gálico

Donde se obtuvo el coeficiente de correlación lineal (R^2) que indica el grado de relación entre ambas variables y la ecuación de la tendencia lineal que corresponde a:

$$y = 0.001710 x \quad R^2 = 0.995915$$

Posteriormente, la ecuación obtenida se utilizó para interpolar los resultados espectrofotométricos del contenido de fenoles totales presentes en las manzanas con y sin tratamientos.

Se siguió la técnica de Folin-Ciocalteu como se describió en materiales y métodos para el conteo de compuestos fenólicos en las manzanas. Las lecturas espectrofotométricas fueron tratadas con la ecuación anteriormente obtenida de la siguiente forma:

$$[\text{Fenoles totales}] = \frac{\text{Absorbancia obtenida}}{0.001710}$$

Tabla 8: Concentración de fenoles totales presentes en las manzanas ‘Red Delicious’ sin tratamiento

<i>Muestra</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>Fenoles totales (mgEAG/g de peso fresco)</i>
Manzana 1	0.7731	454.7647
Manzana 2	0.7174	419.4169
Manzana 3	0.7539	443.4705
	Promedio	439.2173
	D.E.	18.0536
	C.V.	4.1104

Resultados similares fueron obtenidos por Tsao *et al.* (2003), indican que el contenido de compuestos fenólicos en el mesocarpio y endocarpio de manzanas ‘Red Delicious’ con la misma técnica fue de 445.8 mg/g de peso fresco, en la investigación se obtuvo una concentración promedio de 439.21±18.0536 mg/g de peso fresco obteniendo un coeficiente de variación del 4% que indica que hubo poca variación en las muestras. Debido a que los resultados obtenidos experimentalmente son muy similares a los reportados en la bibliografía se puede concluir la efectividad del método para contabilizar la concentración de fenoles totales presentes en las manzanas.

3.3 Caracterización de los sistemas coloidales.

a) Tamaño de partícula e índice de polidispersión

En la Tabla 9 se muestran los tamaños de partícula e índices de polidispersión para los sistemas coloidales durante seis semanas de almacenamiento a 4 ± 1 °C.

La emulsión y la emulsión con goma prácticamente tuvieron el mismo comportamiento durante las seis semanas de almacenamiento; sin embargo, el tamaño varió teniendo menores tallas de partícula en las muestras con xantana. En la segunda semana ambos sistemas presentaron un descenso del diámetro de partícula y posteriormente un aumento gradual en el tamaño de partícula debido a la floculación, alcanzando 1363 nm de diámetro en la emulsión y 1122 nm para la emulsión con goma en la sexta semana.

La nanoemulsión con goma tuvo una ligera disminución del tamaño de partícula con respecto a la nanoemulsión, estos sistemas mostraron una diferencia de entre 15 y 50 nanómetros a lo largo del periodo de almacenamiento; también, este comportamiento se presenta entre las muestras de nanocápsulas con y sin goma xantana.

En general el tamaño de partícula disminuyó en los sistemas a los cuales se les adicionó goma xantana posiblemente por la agitación posterior a los que fueron sometidos para lograr que la goma quedara homogénea en el sistema; Hennock *et al.* (1984) mencionan que en una emulsión la goma xantana contribuye a incrementar la viscosidad de la fase acuosa y disminuye el tamaño de partícula promedio.

Con respecto a los índices de polidispersión (Tabla 9), los sistemas a los cuales se les adicionó goma xantana tuvieron valores más pequeños que los sistemas sin xantana, esto es atribuido a la propiedad de la goma de aumentar la viscosidad de la fase continua en los sistemas dispersos inhibiendo así la floculación y manteniendo con ello el tamaño de la partícula por más tiempo.

b) Potencial Zeta (ζ)

De acuerdo a los potenciales zeta obtenidos para los sistemas coloidales (Tabla 10), se muestra que la adición de goma xantana provocó una disminución en dicho parámetro

Tabla 9: Tamaño de partícula e índice de polidispersión de los sistemas coloidales almacenados durante seis semanas.

Tiempo	Emulsión		Emulsión con goma		Nanoemulsión		Nanoemulsión con goma		Nanocápsulas		Nanocápsulas con goma	
	T.P. (nm)	I.P.	T.P. (nm)	I.P.	T.P. (nm)	I.P.	T.P. (nm)	I.P.	T.P. (nm)	I.P.	T.P. (nm)	I.P.
Semana 1	1174±17	0.773±0.19	1166±38.5	0.717±0.16	175.7±23.6	0.325±0.03	116±2.3	0.296±0.015	316.7±24.5	0.387±0.01	296.9±4.5	0.237±0.03
Semana 2	565±20.4	0.527±0.04	880±87.6	0.646±0.12	149.4±12.5	0.261±0.01	110.9±1.2	0.285±0.013	228.8±96	0.346±0.06	295.1±9.7	0.239±0.05
Semana 3	944.6±48.4	0.823±0.06	738±67.5	0.668±0.03	158.5±3.5	0.262±0.005	103.8±1.1	0.292±0.003	274.5±54.5	0.31±0.04	275.7±6.4	0.302±0.02
Semana 4	1155±162	0.848±0.06	752±102.8	0.656±0.01	189.3±6.7	0.268±0.006	113.1±2.7	0.275±0.001	333.4±28.7	0.193±0.05	309.3±3.25	0.278±0.01
Semana 5	1218±127	0.809±0.12	956±50.9	0.838±0.02	132.4±2.95	0.401±0.03	118.2±3.23	0.345±0.004	362.5±13.61	0.197±0.01	308.2±9.2	0.281±0.01
Semana 6	1363±13.4	0.61±0.004	1122±57.2	0.786±0.02	168.1±46.1	0.262±0.014	110±1.9	0.32±0.02	424±172.8	0.838±0.34	316.7±15.6	0.358±0.05

T.P. Tamaño de partícula; I.P. Índice de polidispersión.

Los valores son la media de tres mediciones ± D.E.

Tabla 10: Potencial Zeta de los sistemas dispersos durante seis semanas de almacenamiento.

Tiempo	Potencial Zeta (mV)					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Emulsión	-51.4 ± 2.5	-50.53 ± 0.92	-46.63 ± 0.50	-61.33 ± 1.73	-51.7 ± 2.61	-53.43 ± 0.70
Emulsión con goma	-66.9 ± 0.95	-40 ± 1.09	-54.8 ± 2.56	-72.7 ± 0.52	-53.63 ± 1.45	-52.86 ± 1.36
Nanoemulsión	-53.96 ± 2.35	-40.36 ± 1.09	-41.33 ± 1.10	-42.13 ± 0.65	-46.5 ± 1.12	-43 ± 2.40
Nanoemulsión con goma	-60.06 ± 0.68	-50.9 ± 1.53	-41.36 ± 3.51	-39.53 ± 1.00	-57.5 ± 2.01	-64.26 ± 4.24
Nanocápsulas	-28.76 ± 2.05	-30.1 ± 2.33	-37.46 ± 0.49	-22.76 ± 0.70	-21.9 ± 1.35	-14.33 ± 1.27
Nanocápsulas con goma	-42.33 ± 2.13	-35.66 ± 0.55	-28.43 ± 2.65	-36.26 ± 0.55	-30.73 ± 1.33	-31.1 ± 0.77

Los valores son la media de tres mediciones ± D.E.

lo cual es favorable ya que entre más lejano a cero sea se produce una mayor estabilidad en el sistema (Karlsson *et al.*, 2005). La reducción en el valor del potencial zeta es debido a que la goma xantana es un compuesto iónico o cargado negativamente, su esqueleto está formado por unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ D-glucosa, en cada unidad de glucosa alternada hay un trisacárido en la cadena lateral conteniendo un ácido D-glucurónico entre dos D-manosas (D'Angelo, 2006), la manosa más cercana a la cadena principal tiene un éster de ácido acético, mientras que la manosa final del trisacárido tiene un enlace entre los carbonos 6 y 4 al segundo carbono de un ácido pirúvico (Figura 12) (Sworn, 2009).

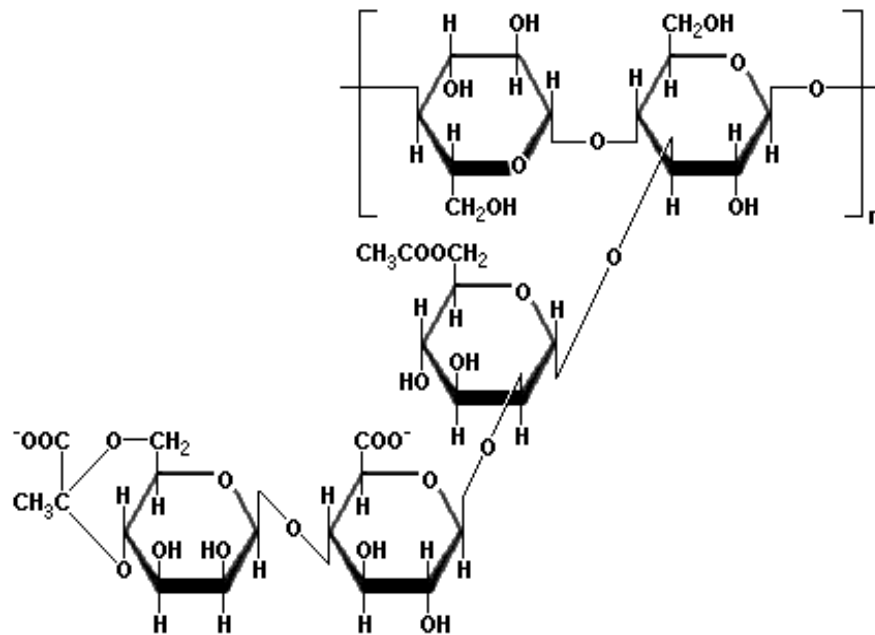
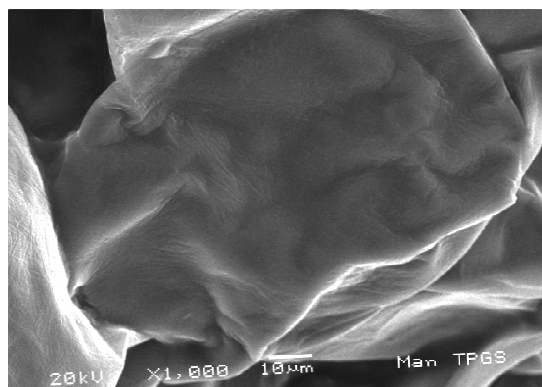


Figura 12: Estructura primaria de la goma xantana (Adaptado de Sworn, 2009).

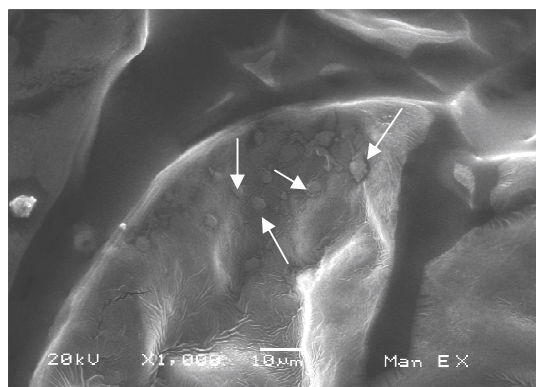
Los dos aniones carboxilato de cada uno de los dos monosacáridos en los trisacáridos de las cadenas laterales, contribuyen a la alta densidad de carga de la molécula de la goma xantana (Hennock *et al.*, 1984). Por lo tanto, al adicionar la goma xantana, esta conduce a incrementar la carga superficial negativamente de las gotas de la emulsión o las nanopartículas, provocando un incremento negativo en el potencial zeta (Mirhosseini *et al.*, 2008).

c) Microscopía electrónica de barrido (SEM)

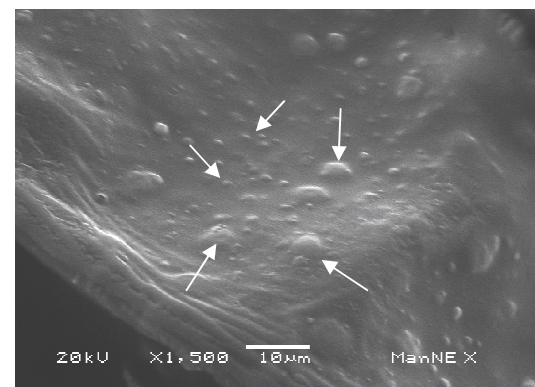
En la Figura 13 se presentan las micrografías de los sistemas coloidales con xantana y la solución de TPGS aplicados en la superficie cortada de las manzanas ‘Red Delicious’.



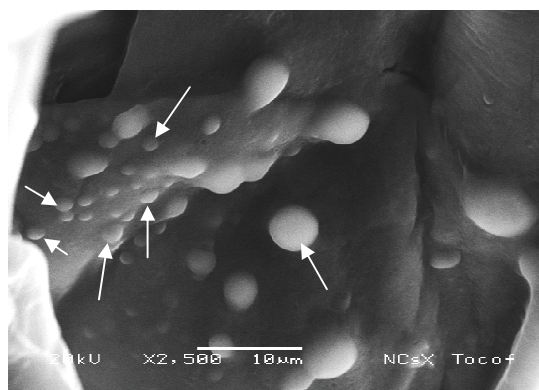
(a)



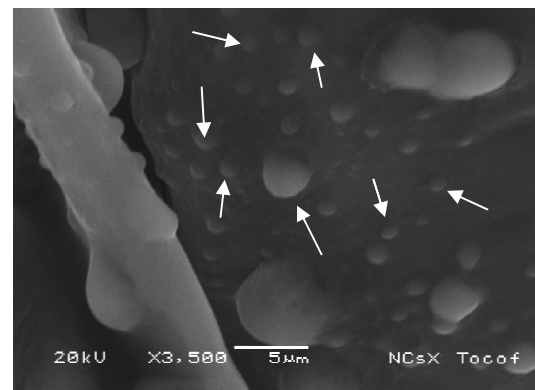
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 13: Micrografías de los recubrimientos aplicados sobre manzanas ‘Red Delicious’ cortadas. (a) Solución de TPGS; (b) Emulsión con goma xantana; (c) Nanoemulsión con goma xantana; (d) y (e) Nanocápsulas con goma xantana. Las flechas señalan los diferentes tamaños de las vesículas formadas en la superficie de las manzanas.

El tamaño de las partículas muestra un incremento con respecto a las tallas de partícula obtenidos para los sistemas coloidales antes de recubrir las manzanas. Por ejemplo, el diámetro del glóbulo en la emulsión antes de tratar a las manzanas fue de 1166 nm, en cambio en las micrografías se observa que dichos glóbulos tuvieron un tamaño entre 2 y 5 μm , de igual forma en la nanoemulsión y nanocápsulas antes de ser aplicadas tenían un tamaño de partícula de 166 nm y 296 nm respectivamente, después de ser aplicadas en la superficie cortada de las manzanas alcanzaron tamaños desde la escala nanométrica hasta 4 o 5 micras, éste incremento posiblemente fue debido a la naturaleza hidrofílica de la goma xantana; por lo tanto, los sistemas dispersos de carácter hidrofóbico tienden a aglomerarse con la finalidad de disminuir el área superficial que está en contacto con la superficie hidrofílica para generar estabilidad en el sistema.

3.4 Efecto de los diferentes tratamientos sobre el índice de oscurecimiento de manzanas ‘Red Delicious’ cortadas y refrigeradas.

En la Figura 14 se muestran los índices de oscurecimiento obtenidos durante los 14 días de almacenamiento para cada tratamiento. En los primeros tres días se observa que existen dos grupos con diferentes índices de oscurecimiento, el primer grupo consta de los recubrimientos de emulsión, nanoemulsión y la solución de TPGS, y el segundo grupo que presenta el menor índice de oscurecimiento que está formado por los tratamientos de ácido ascórbico, goma xantana y nanocápsulas.

Las manzanas tratadas únicamente con CaCl_2 tuvieron el mayor índice de oscurecimiento durante los 12 días de experimentación excepto por el día 14 en donde la solución de TPGS presentó el mayor valor de todos los tratamientos. Esto indica que los tratamientos utilizados permiten aumentar la vida útil de las manzanas frescas cortadas.

Cabe destacar que los recubrimientos de las manzanas tratadas con emulsión, nanoemulsión y la solución de TPGS están compuestas por especies surfactantes como son Tween[®] 80 y Span[®] 80 que conforman la emulsión y la nanoemulsión y la cadena de polietilenglicol que es parte de la estructura del TPGS, es posible que dicha propiedad de estas sustancias tenga un efecto sobre las membranas celulares adyacentes lo que provoca la liberación de compuestos fenólicos hacia el exterior con la subsecuente interacción con la enzima de la polifenoloxidasas; además, los surfactantes pueden activar a las formas

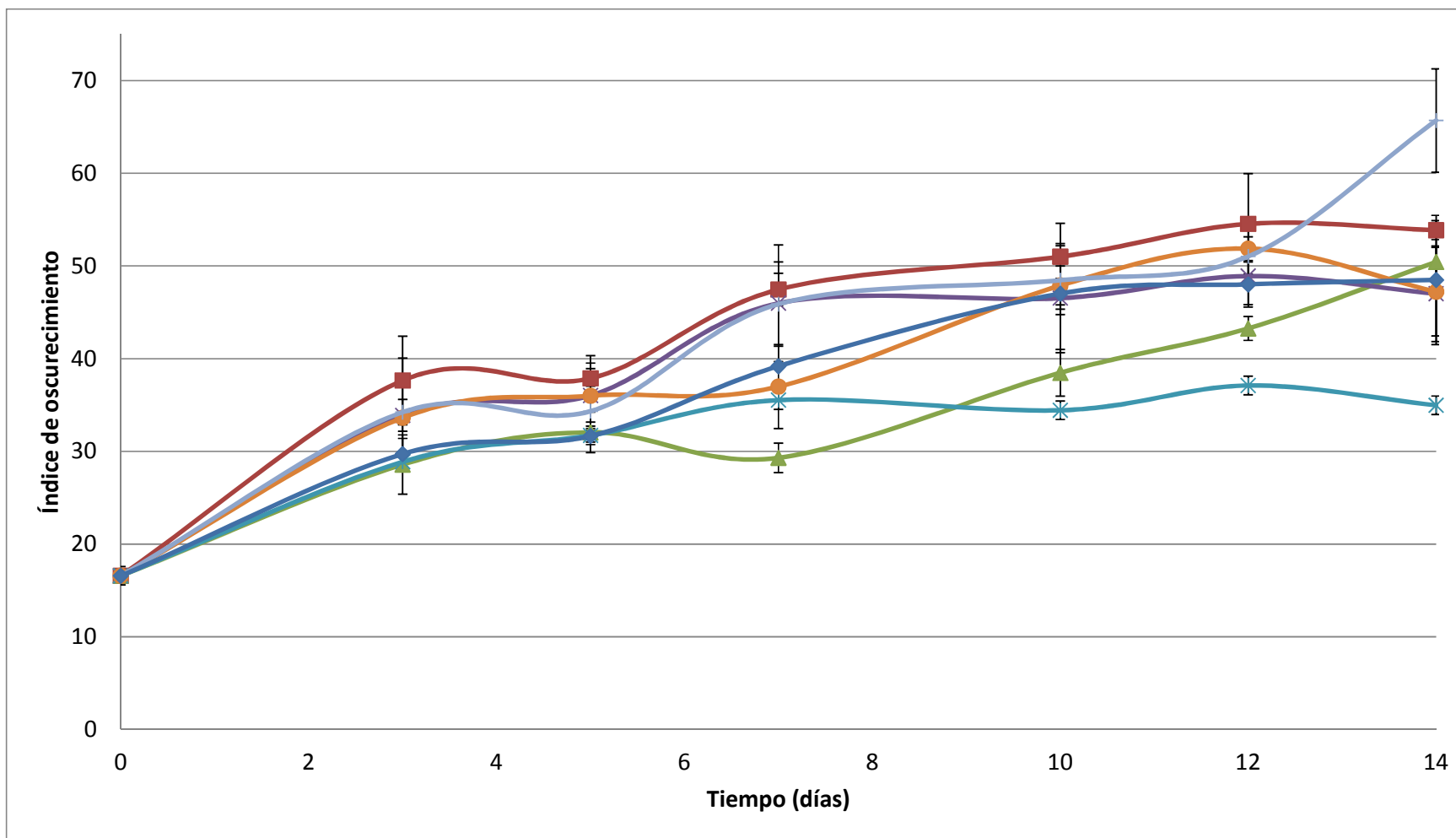


Figura 14: Índice de oscurecimiento de la superficie cortada de manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos y almacenadas durante 14 días. ■ Control; ▲ Ácido Ascórbico; ✕ Emulsión; ✕ Nanocápsulas; ● Nanoemulsión; ✕ Solución; ◆ Goma Xantana.

latentes de la polifenoloxidasa con lo cual hay un incremento en el índice de oscurecimiento (Sapers *et al.*, 1989).

Al final del periodo de prueba se observó que la solución de TPGS muestra el mayor índice de oscurecimiento debido a su capacidad surfactante. Yan *et al.* (2009), mencionan que este compuesto tiene un mayor efecto sobre la tensión superficial que Triton[®] X-100; debido a esto, incrementa la liberación de compuestos fenólicos de las células intactas lo que produce un aumento en el índice de oscurecimiento a comparación de las muestras control que se esperaba que estas fuese mayor. En la nanoemulsión y emulsión el comportamiento del índice oscurecimiento es parecido alcanzando valores en este parámetro de 47.22 ± 4.7 y 47.01 ± 5.15 respectivamente en el último día de prueba.

Los tratamientos de ácido ascórbico, xantana y nanocápsulas tuvieron los menores índices de oscurecimiento durante los primeros tres días de almacenamiento, debido a que el primero reduce las quinonas de color amarillo a su correspondiente difenol incoloro (Osuga y Whitaker, 1995). Mientras que los hidrocoloides naturales generalmente proveen una buena barrera al oxígeno y a la transmisión de CO₂ (Rojas-Graü, 2006); por lo tanto, la goma xantana actúa como obstáculo a la transferencia de oxígeno inhibiendo la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos ya que el O₂ es fundamental para que dicha reacción ocurra (Zhao y McDaniel, 2005). Éste fenómeno se produce hasta el día 5, posteriormente hay una diferencia radical entre las nanocápsulas y la goma xantana posiblemente por la degradación de la goma; sin embargo, las nanocápsulas conservaron un efecto para inhibir el oscurecimiento.

El ácido ascórbico en los primeros días inhibió el oscurecimiento enzimático, el cual aumentó considerablemente en el décimo día debido a que el compuesto perdió su actividad reductora; además, el índice de oscurecimiento fue mayor en comparación con la emulsión, nanoemulsión y la goma xantana, en el último día de prueba, atribuido a que el dehidroascorbato (la forma oxidada del ácido ascórbico) es una sustancia inestable que puede ser hidrolizada irreversiblemente a ácido 2,3-dicetogulónico, esta reacción produce la pérdida de su actividad biológica (Zerdin, *et al.*, 2003). La oxidación del ácido ascórbico puede resultar en la formación de furfural por descarboxilación y deshidratación, con la

subsecuente polimerización, resultando en la formación de pigmentos oscuros (Erdman y Klein, 1982).

Con el recubrimiento de nanocápsulas se obtuvieron los menores índices de oscurecimiento de todos tratamientos utilizados durante la última semana de experimentación, de acuerdo con el análisis estadístico ANOVA los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al índice de oscurecimiento ($p < 0.05$), lo que indica que los tratamientos tienen un efecto sobre el índice de oscurecimiento en las manzanas 'Red Delicious'; también, las nanocápsulas aumentaron la vida útil de las manzanas frescas cortadas una semana con respecto a las manzanas control y dos días con respecto a uno de los tratamientos más utilizados para prevenir el oscurecimiento enzimático como es el ácido ascórbico.

3.5 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de la polifenoloxidasas en manzanas 'Red Delicious' cortadas y refrigeradas.

La determinación de la actividad polifenoloxidasas de las manzanas frescas cortadas con los diferentes tratamientos y refrigeradas durante 14 días se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. En la Figura 15 se muestran los resultados de la actividad de la enzima polifenoloxidasas para los tratamientos utilizados durante 14 días en refrigeración a 4 ± 1 °C.

En las muestras control la actividad disminuyó a lo largo del periodo de almacenamiento, iniciando con un aumento en la actividad de la enzima polifenoloxidasas en el tercer día con el subsecuente decremento de esta durante los siguientes días de almacenamiento. Esto es debido a que los productos de oxidación de los compuestos fenólicos tienen el potencial de interactuar con las proteínas, generando condensaciones covalentes. Los grupos $-SH$ y $-NH_2$ de los aminoácidos son más susceptibles a la unión o alquilación por quinonas. La formación del enlace quinona-proteína puede resultar en cambios en las características estructurales, nutricionales y funcionales de las proteínas (Yoruk y Marshall, 2003), lo que conduce a una reducción en la actividad catalítica (Stelzig *et al.*, 1972).

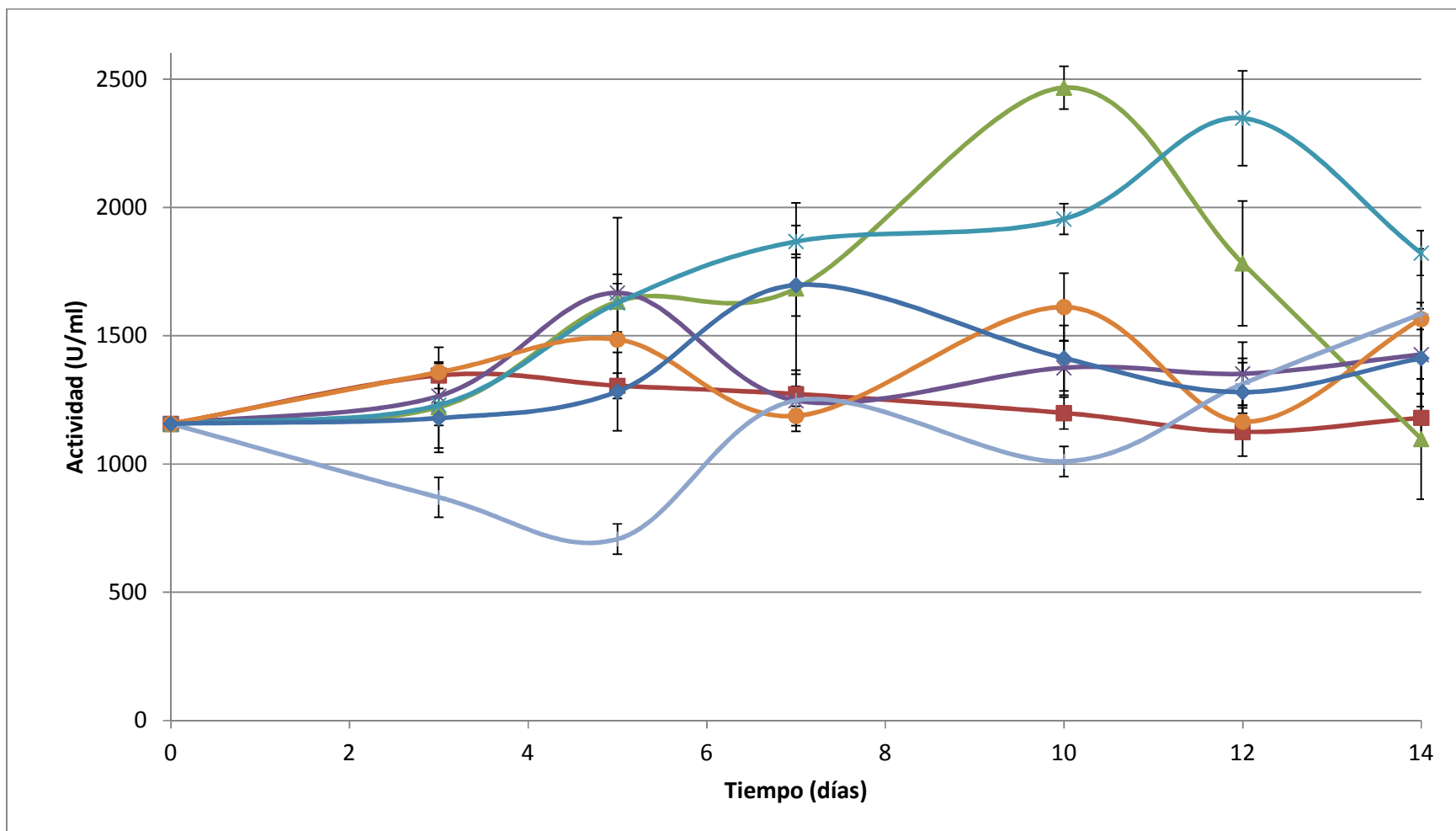


Figura 15: Actividad polifenoloxidasas en manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos almacenadas durante 14 días. ■ Control; ▲ Ácido Ascórbico; × Emulsión; * Nanocápsulas; ● Nanoemulsión; + Solución; ◆ Goma Xantana.

En la mayoría de las manzanas tratadas se observó una disminución en la actividad enzimática con respecto al tiempo de almacenamiento; sin embargo, el momento en que ocurre varía de acuerdo al tratamiento utilizado, donde existe un máximo de actividad y la subsecuente reducción de esta. En las muestras control el máximo de actividad se presentó en el tercer día, en la emulsión en el quinto día, las manzanas con goma xantana y solución de TPGS mostraron un incremento en la actividad en el día 7, en las muestras tratadas con ácido ascórbico y con nanoemulsión en el décimo día y con el tratamiento de nanocápsulas hasta el doceavo día.

Por otra parte, las manzanas tratadas con ácido ascórbico y con nanocápsulas de acetato de dl- α -tocoferol presentaron un comportamiento similar (Figura 16), incrementando durante el periodo de prueba, además presentaron las mayores actividades enzimáticas de todos los sistemas estudiados, las manzanas tratadas con ácido ascórbico tuvieron en el día 10 una actividad enzimática promedio de 2467.5 U/ml, mientras que las manzanas recubiertas con las nanocápsulas alcanzaron una actividad promedio de 2348.33 en el día 12 con la posterior disminución de la actividad catalítica.

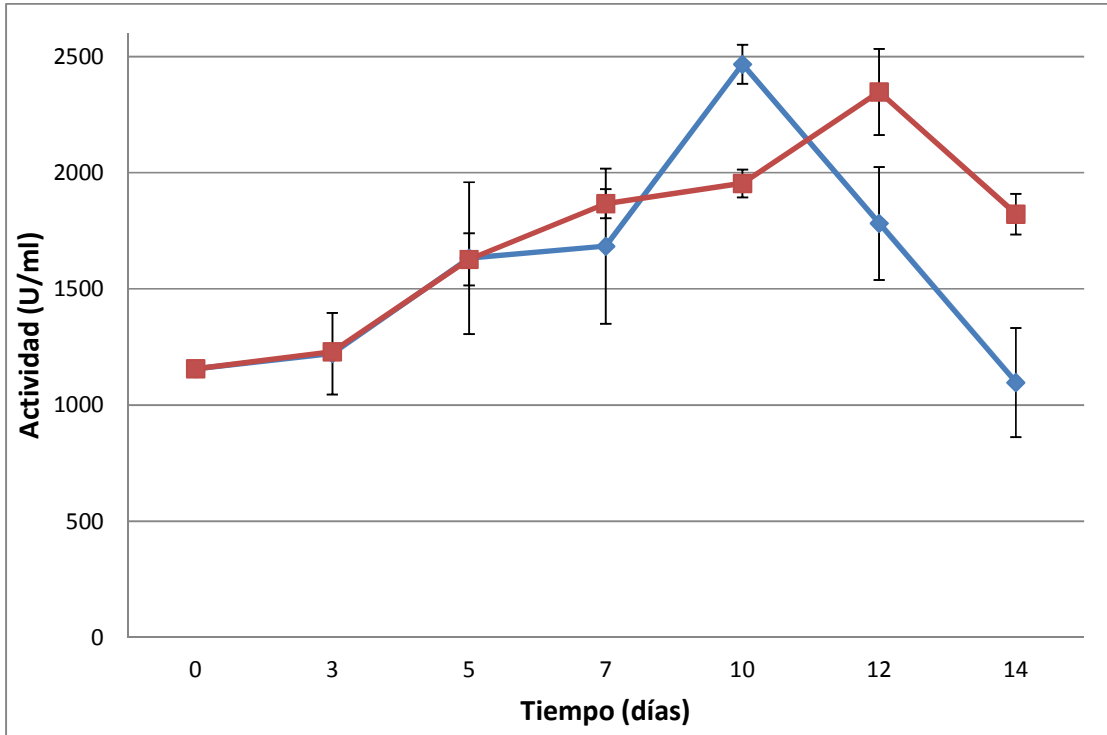


Figura 16: Actividad PFO en las manzanas tratadas con ácido ascórbico y nanocápsulas.

■ Actividad PFO Ácido Ascórbico; ■ Actividad PFO Nanocápsulas.

El ácido ascórbico es un compuesto reductor que transforma las *o*-quinonas al sustrato fenólico original; por lo tanto, la actividad enzimática no se ve afectada ya que las *o*-quinonas no logran unirse a los aminoácidos para formar las melaninas, este efecto se observa hasta el día 10 donde todo el ácido ascórbico ha sido oxidado a dehidroascorbato, posteriormente hay un descenso en la actividad debido a que las *o*-quinonas se unen a los aminoácidos e inactivan a la PFO. Resultados similares reportaron Ji-Hyun y Kwang-Deog (2011) en manzanas de la variedad 'Fuji' tratadas con ácido ascórbico e indican que los restos de ácido ascórbico en la superficie de las manzanas frescas cortadas justo después del procesado, actúa como un agente reductor y después su habilidad disminuye gradualmente desapareciendo al final del periodo de almacenamiento.

Dado que la tendencia de la actividad enzimática de las nanocápsulas es parecida a la del ácido ascórbico, el acetato de dl- α -tocoferol puede tener un mecanismo similar al ácido ascórbico, es decir, tiene una acción reductora.

Se conoce ampliamente el papel de la vitamina E o α -tocoferol como un compuesto inhibidor del ataque oxidativo de los ácidos grasos polinsaturados presentes en las membranas celulares, debido a su capacidad antioxidante, puede donar un hidrógeno e inactivar diferentes especies de radicales libres (Eitenmiller y Lee, 2004). La esterificación del anillo del alfa tocoferol con acetato, succinato, nicotina, etc. protege al tocoferol de la oxidación, puesto que estos grupos ocupan los sitios donde está la actividad antioxidante de este compuesto; debido a esto, se requiere que los ésteres sean hidrolizados, para que el α -tocoferol tenga actividad biológica (Hernández y Sastre, 1999). Además, para que se lleve a cabo la reacción de la PFO es necesaria cierta cantidad de agua (Robb, 1995); por lo tanto, el acetato de dl- α -tocoferol no puede inhibir la enzima PFO ya que es un compuesto hidrofóbico; sin embargo, este puede interactuar con los productos de reacción de la PFO inhibiendo así el oscurecimiento enzimático.

Yan *et al.* (2007) describieron la forma en la cual el compuesto TPGS se hidroliza; el grupo éster que une la cadena de polietilenglicol con el α -tocoferol es hidrolizado enzimáticamente y queda liberado α -tocoferol y la cadena de polietilenglicol. Jensen *et al.* (1999), indican que en la ingesta de acetato de dl- α -tocoferol, éste es hidrolizado por enzimas pancreáticas (hidrolasas de ésteres carboxílicos) antes de ser

absorbidos por el intestino delgado. Goodenough y Entwistle (1982), aislaron enzimas carboxilesterasas de diferentes cultivos de manzanas (en la que se encuentra la variedad utilizada en este estudio) que están implicadas en la formación de los compuestos volátiles.

Tomando en cuenta las investigaciones anteriores y los resultados obtenidos de la actividad enzimática PFO con el recubrimiento de nanocápsulas, se propone el mecanismo de acción del acetato de dl- α -tocoferol para inhibir el oscurecimiento enzimático.

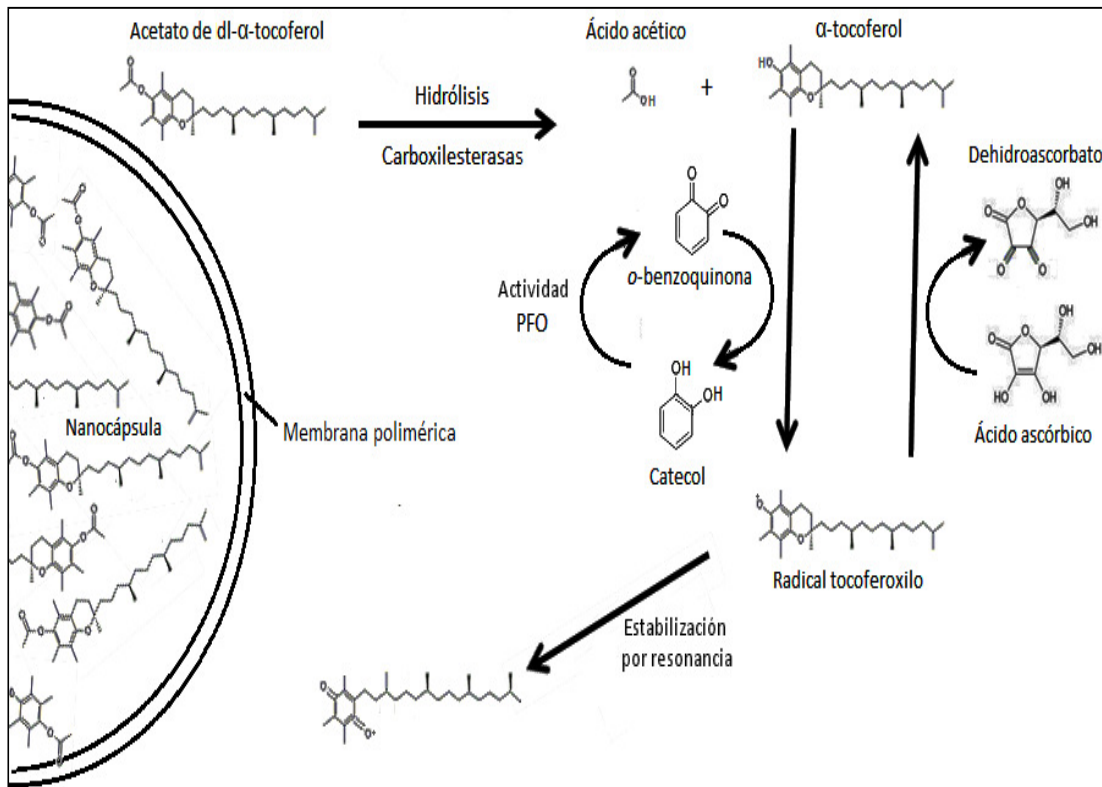


Figura 17: Mecanismo por el cual el α -tocoferol inhibe el oscurecimiento enzimático.

En la Figura 17 se muestra el mecanismo propuesto por el cual el α -tocoferol inhibe el oscurecimiento enzimático, donde el acetato de dl- α -tocoferol es liberado de la nanocápsula por difusión ya que la manzana tiene una mínima cantidad de α -tocoferol, posteriormente el grupo ester del acetato de α -tocoferol es hidrolizado por enzimas intrínsecas de la manzana como carboxilesterasas, reacción que genera ácido acético y α -tocoferol, este último puede interactuar con las quinonas formadas debido a la actividad de la PFO donando su hidrógeno, esto evita que las quinonas se unan a diferentes compuestos incluyendo los grupos -SH y -NH₂ de las proteínas; por lo tanto, se inhibe la formación de

melaninas; además, el α -tocoferol oxidado, nuevamente puede obtener su forma activa mediante la reducción del ácido ascórbico (Eitenmiller y Lee, 2004).

Las muestras tratadas con la emulsión y nanoemulsión de acetato de dl- α -tocoferol también tienen un comportamiento similar con respecto a la actividad de la polifenoloxidasasa durante los 14 días de almacenamiento. En la Figura 18 se muestra la actividad de la enzima polifenoloxidasasa obtenida en las manzanas tratadas con emulsión y nanoemulsión.

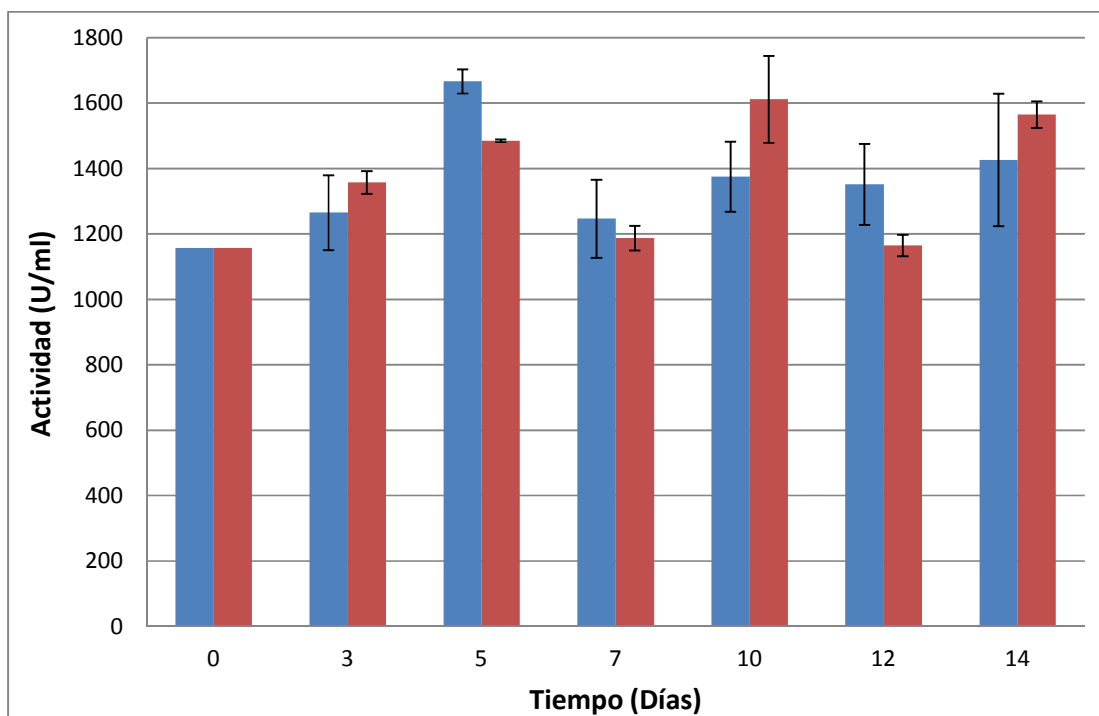


Figura 18: Actividad PFO en manzanas tratadas con nanoemulsión y emulsión almacenadas durante 14 días.

■ Actividad PFO Emulsión; ■ Actividad PFO Nanoemulsión.

Ambos tratamientos presentan un comportamiento parecido, lo que indica que no existe un efecto del tamaño de partícula sobre la actividad enzimática. Esto fue debido a que el tamaño de partícula de la nanoemulsión (Figura 19) aumentó cuando fue aplicado sobre manzanas cortadas, probablemente por las propiedades hidrofóbicas que presentan los compuestos utilizados para la formación de la emulsión y la nanoemulsión (Span[®] 80 y acetato de dl-alfa-tocoferol). En las micrografías se observa que los tamaños en los glóbulos de la emulsión y nanoemulsión son parecidos, por esta razón ambos tratamientos presentan comportamientos similares.

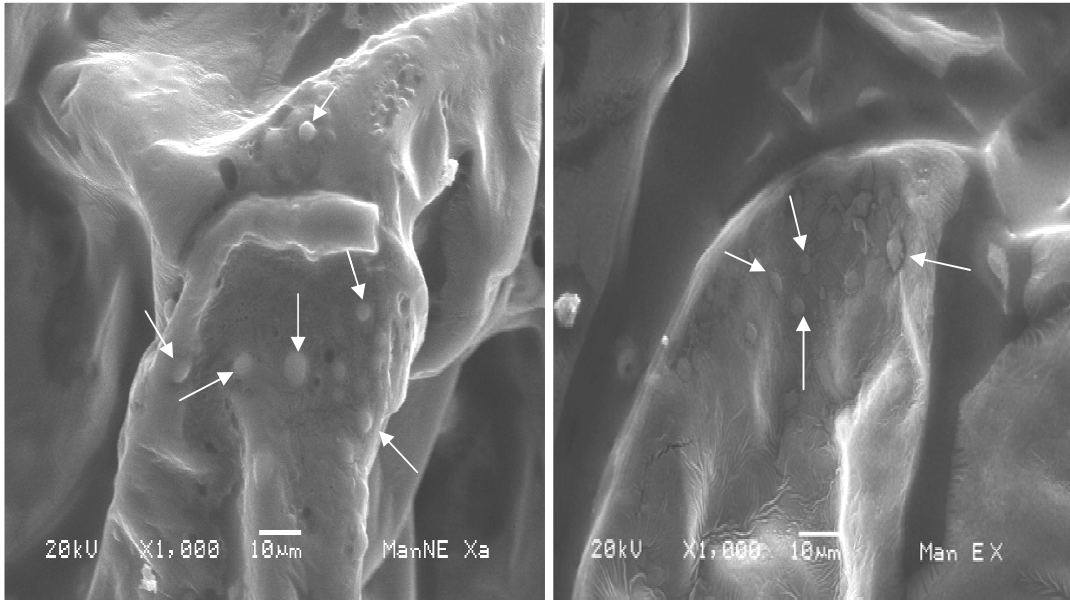


Figura 19: Micrografías de las vesículas formadas en la superficie de las manzanas cortadas con los recubrimientos de nanoemulsión (izquierda) y de emulsión (derecha).

Los índices de oscurecimiento obtenidos para ambos tratamientos (emulsión y nanoemulsión) que se muestran en la Figura 20, confirma que no hubo un efecto del tamaño de partícula sobre el índice de oscurecimiento.

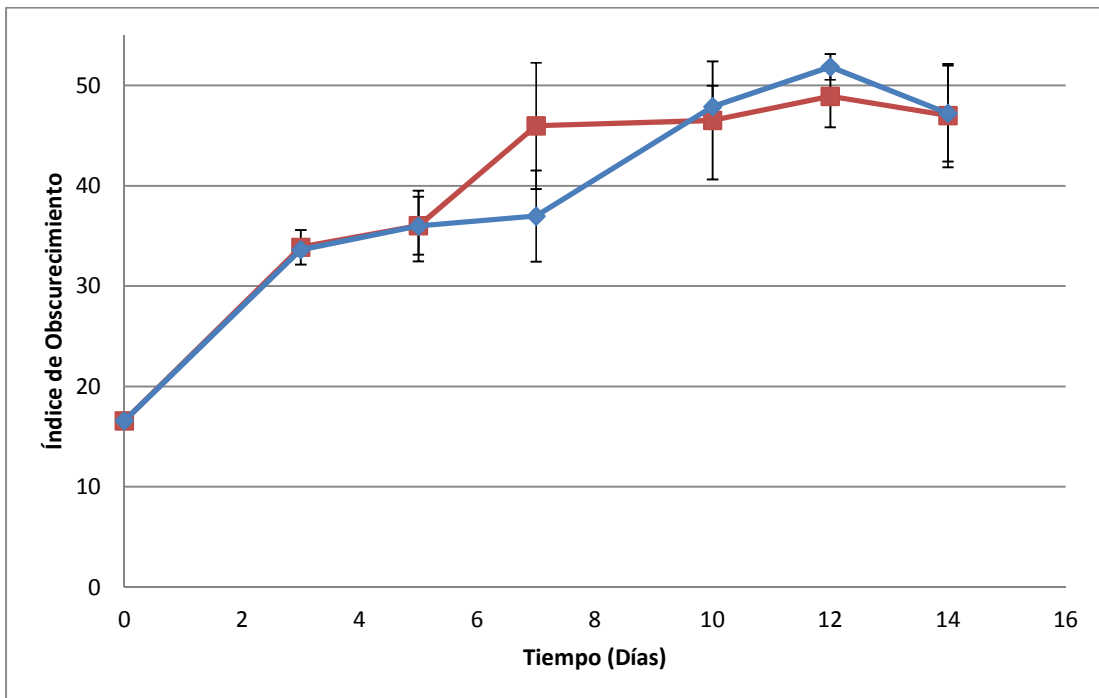


Figura 20: Índices de oscurecimiento obtenidos para las manzanas tratadas con nanoemulsión y emulsión de acetato de dl- α -tocoferol; ■ Índice de Oscurecimiento Emulsión; ◆ Índice de Oscurecimiento Nanoemulsión.

La Figura 20 muestra que el índice de oscurecimiento en las manzanas tratadas con emulsión y nanoemulsión son relativamente iguales con excepción del día 7, como anteriormente se mencionó, debido a que la emulsión presenta un máximo de actividad en el día 5 relacionado con un aumento en el índice de oscurecimiento mientras que la nanoemulsión hasta el día 10 que de igual forma muestra un incremento en el índice de oscurecimiento. Además, el análisis estadístico ANOVA, entre ambos tratamientos mostro que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) con respecto a la actividad de la enzima polifenoloxidasas y el índice de oscurecimiento.

El tratamiento de goma xantana durante los primeros cinco días muestra poca actividad, ya que la goma forma un recubrimiento reduciendo la transferencia de oxígeno; posteriormente, dicha actividad incrementa a 1697.5 U/ml en el día 7 debido a que la xantana es degradada lo que produce un aumento en el intercambio de gases con la introducción de O_2 en los tejidos de las manzanas provocando la activación de la enzima polifenoloxidasas lo que conlleva al aumento en el índice de oscurecimiento en ese mismo día (Figura 21).

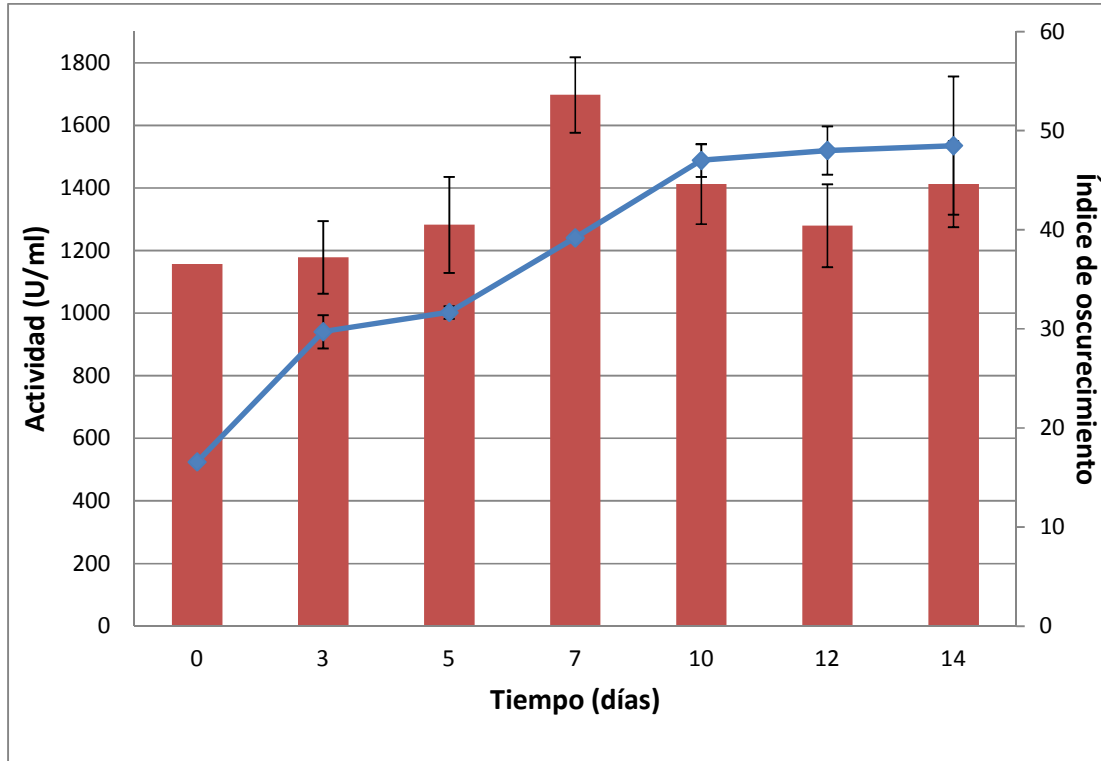


Figura 21: Actividad de la PFO e índice de oscurecimiento en manzanas 'Red Delicious' tratadas con xantana. ■ Actividad de la PFO; ◆ Índice de Oscurecimiento.

Con el tratamiento de solución de TPGS también se muestra una buena relación entre el índice de oscurecimiento y la actividad de la polifenoloxidasas (Figura 22). En el día 7 se obtuvo un incremento considerable en la actividad lo que repercutió notablemente en la producción de compuestos oscuros; además, se observa que en el último día de prueba se tienen altas actividades lo que conlleva al aumento en el índice de oscurecimiento y una disminución en la concentración de compuestos fenólicos.

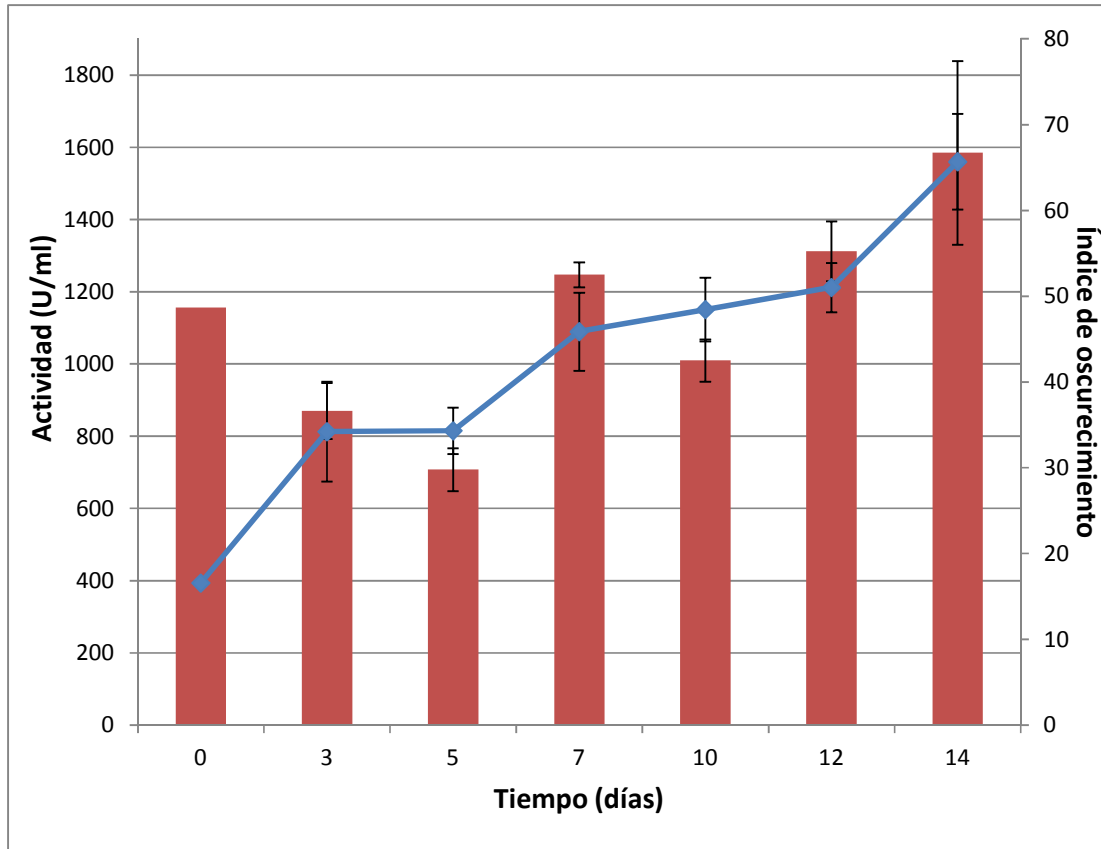


Figura 22: Actividad polifenoloxidasas e índice de oscurecimiento en manzanas tratadas con solución de TPGS. ■ Actividad polifenoloxidasas; ◆ Índice de Oscurecimiento.

De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA obtenido en Minitab®, existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos utilizados y la actividad de la polifenoloxidasas, esto indica que dichos tratamientos tienen un efecto sobre la actividad de la polifenoloxidasas, con lo cual se contrasta con los resultados y los análisis obtenidos.

3.6 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración de fenoles totales en la superficie de las manzanas 'Red Delicious' cortadas y refrigeradas

En la Figura 23 se muestra el contenido de fenoles totales en la superficie de las manzanas con los diferentes tratamientos obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu durante el periodo de almacenamiento.

Las muestras control presentaron un descenso de la concentración de fenoles a lo largo del periodo de almacenamiento. Este comportamiento es congruente debido a que los compuestos fenólicos son convertidos a quinonas los cuales se polimerizan y forman las grandes cadenas poliméricas que sirven en autodefensa de la planta; sin embargo, desde el punto de vista alimenticio esto no es deseable ya que pierde calidad y valor nutricional.

Las manzanas tratadas con ácido ascórbico presentan el mayor contenido de polifenoles durante los primeros cinco días, debido a que los compuestos reductores como el ácido ascórbico reaccionan y reducen rápidamente el reactivo Folin-Ciocalteu; por lo tanto, este compuesto es considerado en la determinación de compuestos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999). En el décimo día se tiene la menor cantidad de compuestos fenólicos, se asumió que este comportamiento es debido a que todo el ácido ascórbico ha sido oxidado; además, hay un incremento en la actividad PFO. La subsecuente acción de la enzima PAL produce un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la superficie lo que conlleva al aumento en la concentración de fenoles observada en los días siguientes.

La concentración de fenoles totales durante los primeros 7 días en las manzanas tratadas con goma xantana decrece hasta alcanzar un contenido de compuestos fenólicos de 408.48 mEAG/g en el séptimo día posiblemente debido a la degradación de la goma xantana, lo que conlleva a un incremento en el intercambio de gases y la disminución en la concentración de compuestos fenólicos por la actividad PFO, subsecuentemente la concentración de fenoles aumenta debido a la activación de la enzima fenilalanina amonialiasa (de las células no dañadas), por el aumento en la respiración ya que la producción de etileno induce la activación de la enzima PAL (Pereyra *et al.*, 2005).

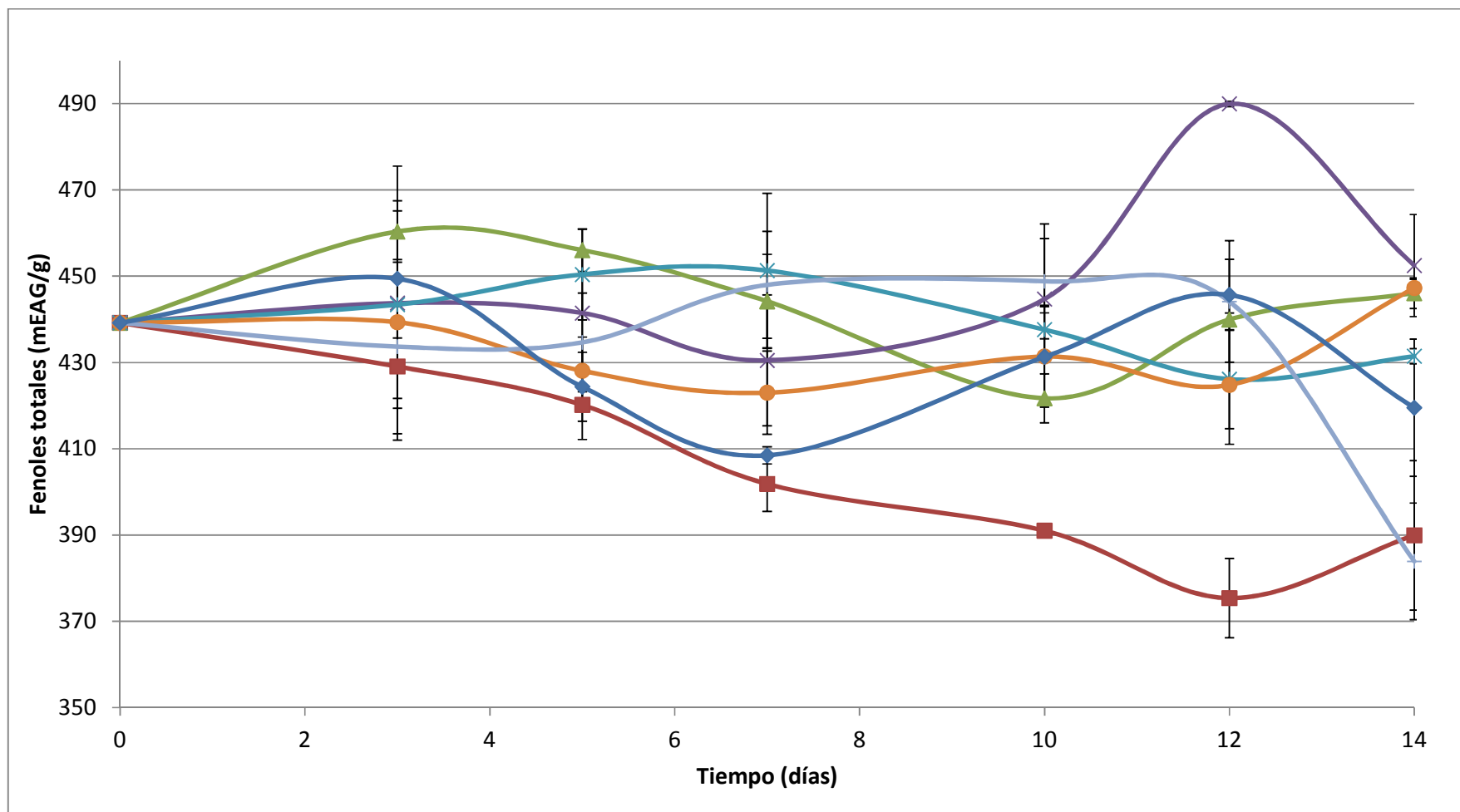


Figura 23: Contenido de fenoles totales en la superficie cortada de las manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos: ■ Control; ▲ Ácido Ascórbico; ✕ Emulsión; ✕ Nanocápsulas; ● Nanoemulsión; + Solución; ◆ Goma Xantana.

El tratamiento con nanocápsulas presentó la mínima concentración de compuestos fenólicos en el día 12, de igual manera como resultado de una alta actividad de la enzimática lo que produce la disminución de los compuestos fenólicos ya que estos son transformados a *o*-quinonas y su posterior polimerización para formar melaninas.

En las manzanas con los tratamientos de emulsión, nanoemulsión y solución de TPGS después del quinto día se tienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos, esto indica que efectivamente hay un efecto de las sustancias surfactantes sobre las membranas celulares adyacentes lo que provoca la liberación de los compuestos fenólicos al exterior y su contabilización con la técnica utilizada. Por otra parte, en el último día de prueba la solución de TPGS tiene un descenso drástico en la concentración de polifenoles esto a su vez se ve reflejado en un incremento en la actividad de la polifenoloxidasas y en el índice de oscurecimiento.

De igual manera, ambos parámetros (tratamientos y concentración de polifenoles) fueron comparados mediante análisis estadístico ANOVA. De acuerdo a éste estudio se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el tratamiento utilizado y la concentración de compuestos fenólicos presentes en la superficie de las manzanas 'Red Delicious'; además, no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el tiempo de almacenamiento y la concentración de fenoles lo cual indica que únicamente los tratamientos tuvieron un efecto sobre la concentración de compuestos fenólicos en la superficie de las manzanas cortadas.

3.7 Relación entre la actividad polifenoloxidasas y el índice de oscurecimiento en manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos.

Coseteng y Lee (1987), estudiaron la relación de los compuestos fenólicos, actividad polifenoloxidasas y el grado de oscurecimiento en diferentes variedades de manzana, encontrando que para cuatro variedades incluyendo la 'Red Delicious', la actividad PFO está directamente relacionada con el grado de oscurecimiento. Por otra parte Amiot *et al.* (1992), investigaron la relación de los compuestos fenólicos con el grado de oscurecimiento, encontrando que en tres tipos de manzana ('Red Delicious', 'Fuji' y 'McIntosh') otros factores aparte de la concentración de polifenoles, como la alta actividad PFO, están involucrados en grado de oscurecimiento.

En la Figura 24 se muestra de manera cualitativa la relación del índice de oscurecimiento y la actividad PFO, donde se observa que un incremento en la actividad enzimática repercute notablemente sobre el índice de oscurecimiento. Este fenómeno se puede contrastar con los resultados obtenidos por Coseteng y Lee (1987) y Amiot *et al.* (1992), indican que en esta variedad de manzana el grado de oscurecimiento está íntimamente relacionado con la actividad PFO y tiene una menor relación con el contenido de compuestos fenólicos.

En las muestras control la relación entre el índice de oscurecimiento y la actividad PFO se muestra en el día tres, en los tratamientos de emulsión y goma xantana en el día 7, en las manzanas con ácido ascórbico y nanoemulsión hasta el día 10, y en las nancápsulas en el día 12 que presenta un incremento en la actividad PFO y en el índice de oscurecimiento, en el tratamiento con TPGS esta relación ocurre durante todo el periodo de prueba.

3.8 Relación entre la concentración de fenoles totales y el índice de oscurecimiento en manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos.

Para contrastar lo antes mencionado en la Figura 25 se muestra la relación del contenido de fenoles totales presentes en la superficie de las manzanas y el índice de oscurecimiento con cada recubrimiento utilizado.

En las manzanas con CaCl_2 muestran el comportamiento esperado, ya que a medida que el índice de oscurecimiento aumenta la concentración de fenoles presentes debe disminuir debido a que son transformados a quinonas. De igual manera en el tratamiento con goma xantana se observa que en el día siete el aumento en el índice de oscurecimiento se ve reflejado en una disminución en la concentración de compuestos fenólicos.

En las muestras tratadas con ácido ascórbico se nota una relación entre el contenido de polifenoles y el índice de oscurecimiento en el decimo día; sin embargo, éste comportamiento puede ser relativo debido a que el ácido ascórbico repercute en el conteo de fenoles totales; por lo tanto, no se obtiene una cantidad real de los compuestos fenólicos presentes en las manzanas con este tratamiento.

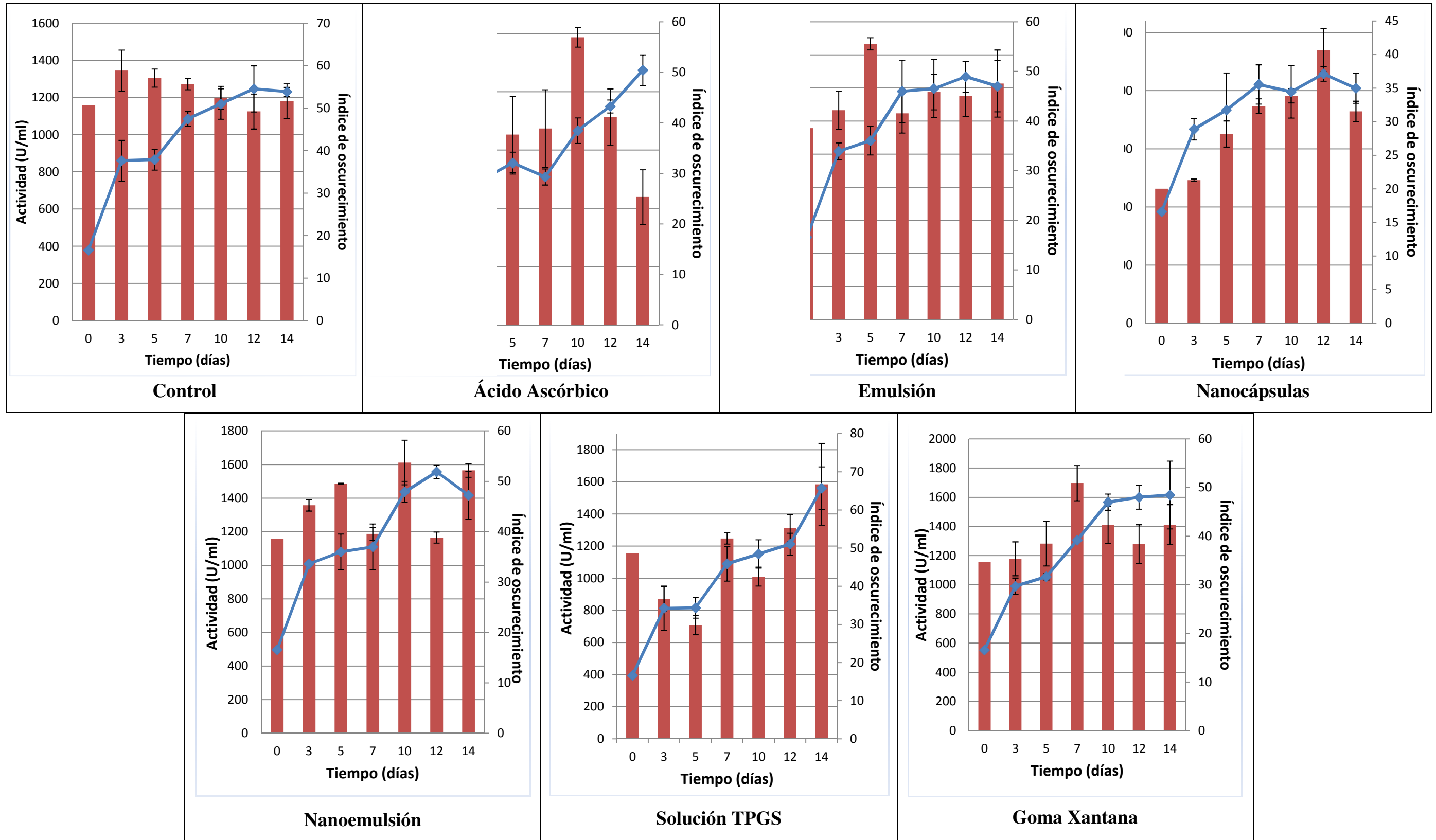


Figura 24: Relación entre la actividad PFO y el índice de oscurecimiento en manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos. ■ Actividad PFO de las manzanas con el recubrimiento; ◆ Índice de oscurecimiento de las manzanas con el recubrimiento.

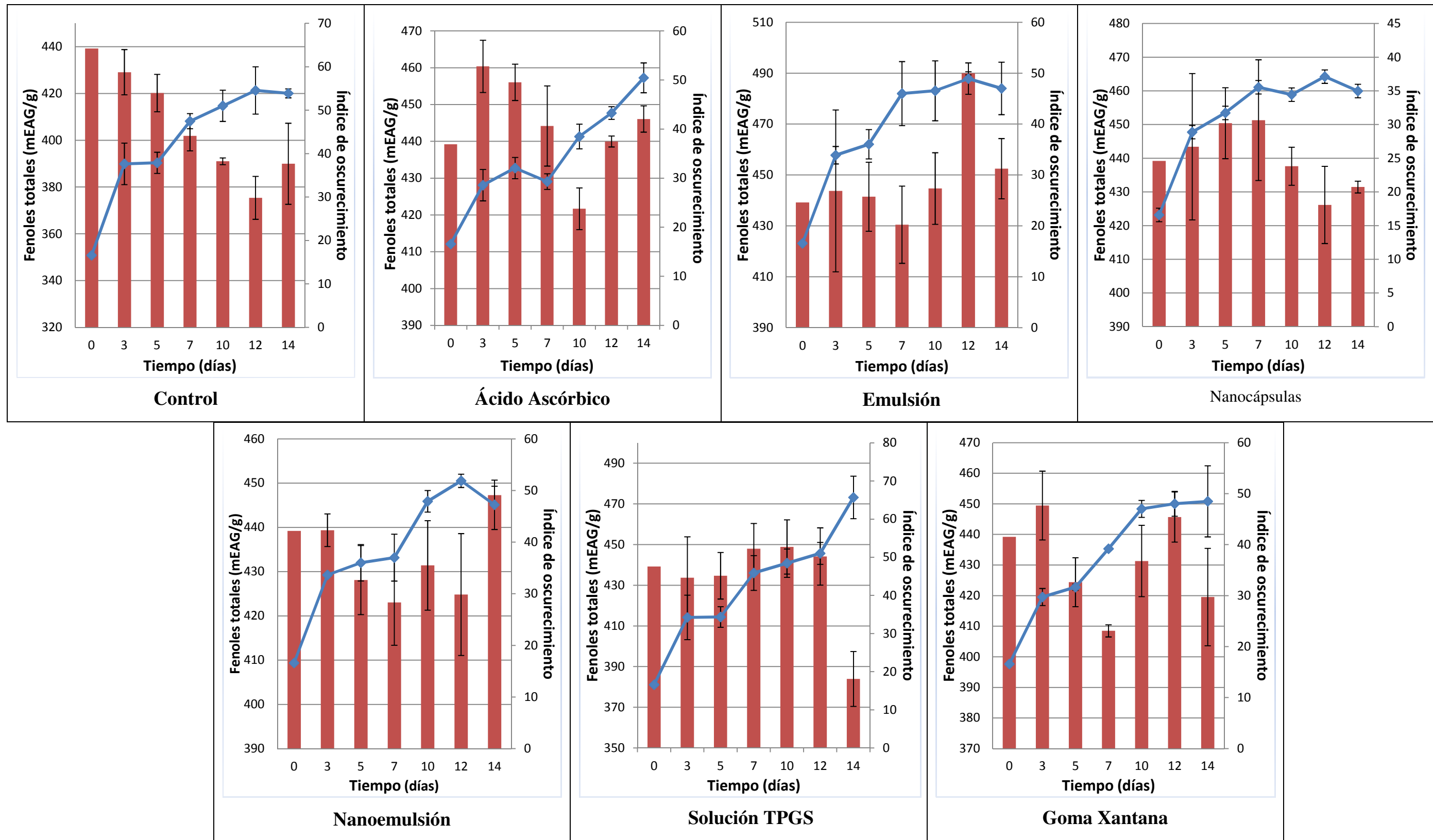


Figura 25: Relación entre la concentración de fenoles totales y el índice de oscurecimiento en manzanas 'Red Delicious' con los diferentes tratamientos. ■ Concentración de fenoles con el recubrimiento; ◆ Índice de oscurecimiento de las manzanas con el recubrimiento.

Por otra parte, el resto de los tratamientos no muestra una relación como antes mencionadas, esto indica que en las manzanas 'Red Delicious' la actividad de la polifenoloxidasa repercute mayormente sobre el índice de oscurecimiento, como indican Amiot *et al.* (1992), de las diferentes clases de compuestos fenólicos presentes en las manzanas sólo dos clases repercuten directamente sobre el índice de oscurecimiento los cuales son flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. En esta última categoría se encuentra el ácido cloragénico que es el mejor sustrato para la PFO en manzanas 'Red Delicious'; además, las *o*-quinonas enzimáticamente producidas a partir de ácidos *o*-dihidroxicinámicos son capaces de oxidar otros compuestos fenólicos mediante mecanismos no enzimáticos. Por lo cual, el grado de oscurecimiento es únicamente dependiente del balance entre los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos y de la actividad de la polifenoloxidasa.

CONCLUSIONES

1.- De acuerdo con los resultados obtenidos, los tratamientos tuvieron un efecto sobre la actividad de la polifenoloxidasas, el cual no se asoció con el tamaño de partícula ya que la talla de los sistemas dispersos aumentó cuando fueron aplicados sobre la superficie cortada de las manzanas, sin embargo, el recubrimiento de nanocápsulas presentó los mejores resultados aumentando la vida útil una semana con respecto a las manzanas control y dos días con respecto a uno de los tratamientos más utilizados para prevenir el oscurecimiento como lo es el ácido ascórbico; además, se logró preservar el contenido de compuestos fenólicos en las manzanas lo que conlleva a mantener su capacidad antioxidante de la fruta. Los tratamientos de la emulsión y la nanoemulsión presentaron resultados similares respecto a la actividad de la polifenoloxidasas y el índice de oscurecimiento. En general los tratamientos alargaron la vida útil de las manzanas 'Red Delicious' cortadas y refrigeradas.

2.- La actividad de la polifenoloxidasas, en la mayoría de los tratamientos (control, emulsión, solución TPGS y goma xantana), presentaron un incremento en la actividad durante los primeros siete días de almacenamiento, mientras que con los tratamientos de ácido ascórbico y con nanocápsulas se logró alargar dicho aumento en la actividad hasta el décimo y doceavo día respectivamente, además este efecto en la actividad se asoció con el aumento en el desarrollo de compuestos oscuros que fueron detectados por colorimetría. Por lo tanto, el índice de oscurecimiento se relacionó principalmente con la actividad de la enzima polifenoloxidasas, en menor medida con el contenido de compuestos fenólicos presentes en la superficie cortada de las manzanas.

3.- El ácido ascórbico y las nanocápsulas presentaron un comportamiento similar con respecto a la actividad polifenoloxidasas; debido a esto, se propuso el mecanismo por el cual el acetato de dl- α -tocoferol actúa para inhibir el oscurecimiento enzimático en las manzanas 'Red Delicious' tratadas; sin embargo, en la nanoemulsión, emulsión y solución de TPGS que también contienen acetato de dl- α -tocoferol este efecto es poco percibido debido a que otros factores como la acción surfactante de los compuestos que conforman dichos tratamientos repercuten en el índice de oscurecimiento.

4.- La adición de goma xantana a los sistemas dispersos ayudó a mantener la estabilidad de los recubrimientos durante más tiempo; sin embargo, al ser aplicados sobre las manzanas los sistemas presentaron un aumento en la talla de la partícula, debido a la hidrofobicidad de los compuestos utilizados.

Bibliografía

- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S. y Nicolas J. (1992). *Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity*. Journal Food Science, 57, 958-962.
- Azeredo, H.M.C. (2009). *Nanocomposites for food packaging applications*. Food Research International, 42, 1240-1253.
- Badui-Dergal, S. (1990). *Química de los alimentos*. Segunda edición, Alhambra Mexicana, Distrito Federal, México.
- Balla, C. y Farkas, J. (2006). Minimally processed fruits and fruit products and their microbiological safety. En: Hui, H. (Ed.). *Handbook of fruit and fruit processing*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.
- Blakistone, B.A. (1999). Introduction. En: Blakistone, B.A. (Ed.). *Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods*. Aspen Publishers, Maryland, USA.
- Chaudhry, Q., Watkins, R. y Castle, L. (2010). Knows, unknowns, and unknowns unknowns. En: Chaudhry, Q., Watkins, R. y Castle, L. (Eds.). *Nanotechnologies in foods*. RSC Publishing. Cambridge Reino, Unido.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. y Clifford, N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. En: Crozier, A., Clifford, M.N. y Ashihara, H. (Eds.). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- D'Angelo, L.L. (2006). Application of hydrocolloids in the beverage industry. En: Williams, P.A. y Phillips, G.O. (Eds.). *Gums and stabilisers for the food industry 13*. RSC Publishing, Cambridge, Reino Unido.

- Dalgleish, D.G. (2004). Food emulsions: their structures and properties. En: Friberg, S.E., Larsson, K. y Sjöblom, J. (Eds.). *Food emulsions*. Cuarta edición, Marcel Dekker Inc., Nueva York, USA.
- Do Nascimento-Nunes, M.C. (2008). *Color atlas of postharvest quality of fruits and vegetables*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Eitenmiller, R. y Lee, J. (2004). *Vitamin E: food chemistry, composition and analysis*. Marcel Dekker Inc, Nueva York, USA.
- Erdman, J.W. y Klein, B.P. (1982). Harvesting, processing, and cooking influences on vitamin C in foods. En: Seib, P.A. y Tolbert, B.M. (Eds.). *Ascorbic acid: chemistry metabolism and uses*. Advances in Chemistry Series 200, American Chemical Society, Washington, USA.
- Eskin, N.A.M., Henderson, H.M. y Townsed, R.J. (1971). *Biochemistry of Food*. Academic Press, Nueva York, USA.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/WorldHealth Organization]. (2009). *FAO/WHO expert meeting on the applications of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications*. FAO y WHO, Roma, Italia.
- Fellows, J.P. (2000). *Food processing technology: principles and practice*. CRC Press, Florida, USA.
- Foladori, G. e Invernizzi, N. (2008). ¿Qué es la nanotecnología? En: Foladori, G. e Invernizzi, N. (Eds.). *Nanotecnologías en la alimentación y agricultura*. Universidad de la República de Montevideo, Uruguay.
- García, E. y Barrett, D.M. (2002). *Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market*. En: Lamikanra, O. (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market*. CRC Press, Florida, USA.

- Gerdemann, C., Eicken, Ch. y Krebs, B. (2002). *The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins*. Accounts of Chemical Research, 35, p.p. 183-191.
- Gershtater, M.C. y Edwards, R. (2007). *Regulating biological activity in plants with carboxylesterases*. Plant Science, 173, p.p. 579-588.
- Goodenough, P.W. y Entwistle, T.G. (1982). *The hydrodynamic properties and kinetic constant with natural substrates of de esterase from Malus pumila fruit*. European Journal of Biochemistry, 127, p.p. 145-149.
- González-Aguilar, G.A., Ayala-Zavala, F., de la Rosa, L.A. y Álvarez-Parrilla, E. (2010). Phytochemical changes in the postharvest and minimal processing of fresh fruit and vegetables. En: de la Rosa, L.A., Álvarez-Parrilla, E. y González-Aguilar G.A. (Eds.). *Fruit and vegetables phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability*. Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- Gross, M. (1999). *Travels to the nanoworld: miniature machinery in nature and technology*. Perseus Publishing, New York, USA.
- Hennoek, M., Rahalkar, R., y Richmond, P. (1984). *Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions*. Journal of Food Science, 49, p.p. 1271-1274.
- Hernández-Rodríguez, M. y Sastre-Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Díaz de Santos, Madrid, España.
- Herrero, A. y Guardia, J. (1992). *Conservación de frutos: manual técnico*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Hidalgo-Álvarez, R., Martín, A., Fernández, A., Bastos, D., Martínez, F. y de las Nieves, F. (1996). *Electrokinetic properties, colloidal stability and aggregation kinetics of polymer colloids*. Advances in Colloid and Interface Science, 67, p.p. 1-118.

- Huang, Q., Yu, H. y Ru, Q. (2010). *Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology*. Journal Food Science, 75, p.p. 50-57.
- Jackson, J.E. (2003). *Biology of Apples and Pears*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Jensen, S.K., Engberg, R.M. y Hedemann, M.S. (1999). *All-rac- α -tocopherol acetate is a better vitamin E source than all-rac- α -tocopherol succinate for broilers*. The Journal of Nutrition, 129, p.p. 1355-1360.
- Ji-Hyun, J. y Kwang-Deog, M. (2011). *Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activity on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid*. Food Chemistry, 124, p.p. 444-449.
- Kader, A.A., y Barrett, D.M. (2005), Classification, composition of fruits, and postharvest maintenance of quality. En: Barrett, D.M., Somogyi, L. y Ramaswamy, H. (Eds.). *Processing fruits: science and technology*. Segunda edición, CRC Press, Florida, USA.
- Karlsson, O.J. y Schade, B.E.H. (2005). Particle analysis: particle size, particle shape, and structural and surface characterization. En: van Herk, A.M. (Ed.). *Chemistry and technology of emulsion polymerisation*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.
- Klabunde, T., Eicken, Ch., Sacchettini, J.C. y Krebs, B. (1998). *Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center*. Nature Structural Biology, 5, p.p. 1084-1090.
- Lamikanra, O. (2002). Enzymatic effects on flavor and texture of fresh-cut fruits and vegetables. En: Lamikanra, O. (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market*. CRC Press, Florida, USA.

- Lerch, K. (1995) Tyrosinase: molecular and active-site structure. En: Lee, C.Y., y Whitaker, J.R. (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention*. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, USA.
- Lozano, J. (2006). *Fruit manufacturing: scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions, of technological importance*. Springer, Nueva York, USA.
- Luby, J.(2003). Taxonomic classification and brief history. En: Ferree, D., y Warrington I.J. (Eds.). *Apples, Botany, Production and Uses*. CABI Publishing, Nueva York, USA.
- Malvern Instruments Ltd. (2003). *Zetasizer nano series user manual*. Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido.
- Mayer, A.M. (2006). *Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review*. *Phytochemistry*, 67, p.p. 2318-2331.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1978). *Polyphenol oxidases in plants*. *Phytochemistry*, 18, p.p. 193-215.
- McClements, D.J. (1999). *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- McClements, D.J., Decker, E.A. y Weiss, J. (2007). *Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components*. *Journal Food Science*, 72, p.p. 109-124.
- Mirhosseini, H., Tan. Ch.P., Hamid, N.S.A. y Yusof, S. (2008). *Effect of arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion*. *Colloids and Surfaces*, 315, p.p. 47-56.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H. y Elaissari, A. (2010). *Polymer-based nanocapsules for drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, p.p. 113-142.

- Murata, M., Kurokami, Ch. y Homma, S. (1992). *Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (Malus pumila)*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, p.p. 1705-1710.
- Nagarajan, R. (2008). Nanoparticles: building blocks for nanotechnology. En: Nagarajan, R. y Hatton, T.A. (Eds.). *Nanoparticles: synthesis, stabilization, passivation, and functionalization*. ACS Symposium Series 996. Washington, USA.
- Núñez-Rivera, D., Obón de Castro, C., Ríos-Ruiz, S., Selma-Fernández, C., Méndez-Colmenero, F., Verde-López, A. y Cano-Trigueros, F. (1996). *Frutos secos, oleaginosos, frutales de hueso, almendros y frutales de pepita*. Universidad de Murcia, España.
- O'Rourke, D. (2003). World production, trade, consumption and economic outlook for apples. En: Ferree, D.C. y Warrington I.J. (Eds.). *Apples, Botany, Production and Uses*. CABI Publishing, Nueva York, USA.
- Olivas, G.I. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). *Edible coatings for fresh-cut fruits*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 657-670.
- Pavlat, A.E. y Orts, W. (2009). Edible films and coatings: why, what, and how? En: Embuscado, M.E. y Huber, K.C. (Eds.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, Nueva York, USA.
- Pereyra, L., Roura, A.I. y del Valle, C.E. (2005). *Phenylalanine ammonia lyase activity in minimally processed Romaine lettuce*. *LWT*, 38, p.p. 67-72.
- Pichot, C. (2008). Reactive nanocolloids for nanotechnologies and microsystems. En: Elaissari, A. (Ed.). *Colloidal nanoparticles in biotechnology*. Wiley-Interscience, Nueva Jersey, USA.

- Poul, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J. y Swanson, B.G. (1999). *Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree*. *Journal of Food Science*, 64, p.p. 42-45.
- Pray, L. y Yaktine, A. (2009). *Nanotechnology in food products: workshop summary*. The National Academy Press, Washington, USA.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. y Doelker, E. (1998a). *Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, p.p. 1113-1128.
- Quintanar-Guerrero, D., Alléman, E., Doelker, E. y Fessi, H., (1998b). *Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique*. *Pharmaceutical Research*, 15, p.p. 1056-1062.
- Ramirez, E.C., Whitaker, J.R. y Virador, V.M. (2003). Polyphenol oxidase. En: Whitaker, J.R., Voragen A.G.J., y Wong, D.W.S. (Eds.). *Handbook of food enzymology*. Marcel-Dakker Inc., Nueva York, USA.
- Robb, D.A. (1995). Exploiting activity in aqueous and nonaqueous media. En: Lee, C.Y., y Whitaker, J.R. (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention*. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, USA.
- Rojas-Graü, M.A. (2006). Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: una nueva estrategia de conservación. Tesis doctoral. Universidad de Lleida, España.
- Rojas-Garü, M.A., Garner, E. y Martín-Belloso, O. (2011). The fresh-cut fruits and vegetables industry: current situation and market trends. En: Martín-Belloso, O., y Soliva-Fortuny, R. (Eds.). *Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing*. CRC Press, Florida, USA.

- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2009). *Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review*. Trends in Food Science & Technology, 20, p.p. 438-447.
- Rolle, R.S., y Chism III, G.W. (1987). *Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables*. Journal of Food Quality, 10, p.p. 157-177.
- Saltveit, M.E. (2010) Synthesis and metabolism of phenolics compounds. En: de la Rosa, L.A., Álvarez-Parrilla, E. y González-Aguilar G.A. (Eds.). *Fruit and vegetables phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Sánchez-Reyes, V. (2011). *Efecto del recubrimiento a base de nanocápsulas de vitamina E, sobre el índice de oscurecimiento de rebanadas de manzana variedad Red Delicious*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Sapers, G.M., Hicks, K.B., Phillips, J.G., Garzarella, L., Pondish, D.L., Matulaitis, R.M., McCormack, T.J., Sondey, S.M., Seib, P.A. y El-Atawy, Y.S. (1989). *Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents*. Journal of Food Science, 54, p.p. 997-1002.
- Scampicchio, M., Wang, J., Blasco, A.J., Sanchez-Arribas, A., Mannino, S. y Escarpa, A. (2006). *Nanoparticle-based assays of antioxidant activity*. Analytical Chemistry, 78, p.p. 2060-2063.
- Schlimme, D.V. y Rooney, M.L. (1997). Envasado de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. En: Wiley, R.C. (Ed.). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Acirbia, Zaragoza, España.
- Sellés-Marchat, S. (2007) *Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (Eriobotrya japonica cv. Algeria): enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas*. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante, España.

- Shahidi, F. y Naczk, M. (2004). *Phenolics in foods and nutraceuticals*. CRC Press, Florida, USA.
- Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T. y Ikeda, M. (2004). *The toxicology and safety of apple polyphenol extract*. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 959-967.
- Simon, R.A. e Ishiwata, H. (2003). Adverse reactions to food aditives. En: D´Mello, J.P.F. (Ed.). *Food safety: contaminants and toxins*. CABI Publishing, Massachusetts, USA.
- Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuera-Raventós, R. (1999). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. *Methods in Enzymology*, 299, p.p. 152-178.
- Sinha, N.K. (2006). Apples. En: Hui, Y.H. (Ed.). *Handbook of fruit and fruit processing*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Snyder, O.P. (2002). HACCP and regulations applied to minimally processed foods. En: Novak, J.S., Sapers, G.M., y Juneja, V.K. (Eds.). *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. CRC Press, Florida, USA.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. y García-Celma, M.J. (2005). *Nano-emulsions*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, p.p. 102-110.
- Sommer, A., Ne´eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M. y Harel, E. (1994). *Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase*. *Plant Physiology*, 105, p.p. 1301-1311.
- Souci, S.W., Fachmann, W. y Kraut, H. (1999). *Tablas de composición de alimentos: el pequeño*. Acribia, Zaragoza, España.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S. y Ribeiro, S. (1972). *Catechol oxidase of red delicious apple peel*. *Phytochemistry*, 11, p.p. 535-539.

- Sworn, G. (2009). Xanthan gum. En: Phillips, G.O. y Williams, P.A. (Eds.). *Handbook of hydrocolloids*. Segunda edición, CRC Press, Florida, USA.
- Taiz, L. y Zeiger, E., (2002). *Plant Physiology*. Benjamin/Cummings Pub. Co., California, USA.
- Thompson, A.K. (2003). *Fruit and vegetables: harvesting, handling and storage*. Segunda edición, Blackwell Publishing Ltd., Iowa, USA.
- Thompson, A.K. (2010). *Controlled atmosphere storage of fruits and vegetable*. Segunda edición, CABI Publishing, Massachusetts, USA.
- Toivonen, P. y DeEll, J. (2002). Physiology of fresh-cut fruits and vegetables. En: Lamikanra, O. (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market*. CRC Press, Florida, USA.
- Tsao, R, Yang, R., Christopher, Y. y Zhu, H. (2003). *Polyphenolic profiles in eight apple cultivar using high-performance liquid chromatography (HPLC)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, p.p. 6347-6353.
- U.S.D.A. (2011). *United States Department of Agriculture*. www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl. Visitada 27 de enero de 2011.
- Vermerris, W. y Nicholson, R. (2006). *Phenolic compounds biochemistry*. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Vincent, B. (2005). Colloidal aspects of emulsion polymerisation. En: van Herk, A.M. (Ed.). *Chemistry and technology of emulsion polymerisation*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.

- Wakayama, T. (1995). Polyphenol oxidase activity in Japanese apples. En: Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention*. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, USA.
- Weiss, J., Takhistov, P. y McClements, D.J. (2006). *Functional materials in food nanotechnology*. Journal of Food Science, 71, p.p. 107-116.
- Wen, L. (2001). *Pineapple juice: phenolic composition and enzymatic browning inhibition*. Tesis doctoral, Universidad del Estado de Oregon, USA.
- Whitaker, J.R. y Lee, C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. En: Lee, C.Y., y Whitaker, J.R. (Ed.). *Enzymatic browning and its prevention*. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, USA.
- Wiley, R.C. (1997). Introducción a las frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. En: Wiley, R.C. (Ed.). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Acribia. Zaragoza, España.
- Wojdylo, A., Oszmiański, J. y Laskowski, P. (2008). *Polyphenolic compounds and antioxidants activity of new and old apple varieties*. Journal Agricultural Food Chemistry, 56, p.p. 6520-6530.
- Yahia, E.M. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. En: de la Rosa, L.A., Álvarez-Parrilla, E. y González-Aguilar G.A. (Eds.). *Fruit and vegetables phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Yoruk, R. y Marshall, M.R. (2003). *Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review*. Journal of Food Biochemistry, 27, p.p. 361-422.
- Zambrano-Zaragoza, M.L., Mercado-Silva, E., Gutiérrez-Cortez, E., Castaño-Tostado, E. y Quintanar-Guerrero, D. (2011). *Optimization of nanocapsules preparation by the*

emulsion-diffusion method for food applications. LWT-Food Science and Technology, 44, p.p. 1362-1368.

Zamora, R., Hidalgo, F.J. y Alaiz, M. (1991). *Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. I. Formación de los hidroperóxidos lipídicos*. Grasas y aceites: International Journal of Fats and Oils, 42, p.p. 155-162.

Zerdin, K., Rooney, M.L. y Vermuë, J. (2003). *The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material*. Food Chemistry, 82, p.p. 387-395.

Zhao, Y. y McDaniel, M. (2005). Sensory quality of foods associated with edible film and coating systems and shelf-life extension. En: Han, J.H. (Ed.). *Innovations in food packaging*. Elsevier Science & Technology Books, California, USA.

Zhou P., Smith N., Lee C., (1993) *Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 41, p.p. 532-536.