



**UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

## **TESIS**

**“Efecto del ácido cítrico y ascórbico para reducir la actividad  
de la polifenoloxidasas en pulpa de níspero (*Eriobotrya*  
*japónica*)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO DE  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. DELGADO MEDINA ROMEL  
Bach. HURTADO GUEVARA GIANCARLO**

**ASESORADO POR:**

**Ing. M. Sc. JUAN FRANCISCO ROBLES RUIZ.**

**Lambayeque – Perú**

**2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

## **TESIS**

**"Efecto del ácido cítrico y ascórbico para reducir la actividad de la  
polifenoloxidasa en pulpa de níspero (*Eriobotrya japonica*)"**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO DE INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. DELGADO MEDINA ROMEL.  
Bach. HURTADO GUEVARA GIANCARLO.**

**APROBADO POR:**

---

Ing. M. Sc. Ronald Gutiérrez Moreno.

Jurado Presidente

---

Dr. Sebastian Huangal Scheinaider.

Jurado Secretaria

---

Ing. Julio Humberto Tirado Vásquez.

Jurado Vocal

---

Ing. M. Sc. Juan Francisco Robles Ruiz.

Asesor

## **DEDICATORIA**

A mis padres MELANIO DELGADO DELGADO

y SANTOS JUSTINA MEDINA LLATAS

por su constante e incondicional respaldo

durante mi formación ética y profesional.

Porque cada logro alcanzado por mí,

es una meta cumplida para ellos.

A mi familia por sus innumerables muestras

de aliento y confianza, que hicieron de mí

una persona tenaz y segura.

A la Universidad Nacional PEDRO RUIZ GALLO

por abrirme las puertas de sus aulas y allí

adquirir invalores conocimientos aplicables

que me consolidan como un profesional capaz y eficiente.

**Romel Delgado Medina**

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y por haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad, amor e iluminarme siempre en mi camino, a la Virgen María por ser mi intercedora ante Dios y ser mi fuente de bondad e inspiración.

A mi padre JUAN HURTADO VÍLCHEZ, por darme siempre su incondicional apoyo durante mi formación ética y profesional. A mi madre por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por todo su amor y confianza. Y a mi padre por su esfuerzo que lo caracteriza y que me ha infundado siempre, mostrándome el valor para salir adelante y por su amor. Porque todo lo que soy se lo debo a ellos por inculcarme siempre la importancia de estudiar.

A la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella y adquirir muchas aptitudes para poder estudiar mi carrera, así también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

**Gian Carlo Hurtado Guevara**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios Omnipotente, por permitirnos arribar  
hasta esta maravillosa etapa con salud e inteligencia,  
por iluminar nuestro sendero y contribuir de manera  
celestial a la cristalización de nuestros objetivos.

A los señores(as) técnicos de laboratorios de la FIQIA,  
y a todas aquellas personas que de manera directa  
e indirectamente coadyuvaron en el desarrollo y  
culminación de nuestro trabajo de investigación.

A nuestro Asesor, Ing. M. Sc. Juan Francisco Robles Ruiz,  
a quien expresamos nuestra gratitud y reconocimiento  
por guiarnos en el desarrollo de nuestra tesis,  
por inculcarnos conocimientos y valores.  
También, por incentivarnos a seguir nuestros ideales  
y a mejorar constantemente.

**Romel Delgado Medina, Gian Carlo Hurtado Guevara**

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Págs.</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>20</b>
<b>I. FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>20</b>
<b>1.1. NÍSPERO</b>	<b>20</b>
<b>1.1.1. Origen</b>	<b>20</b>
<b>1.1.2. Taxonomía</b>	<b>21</b>
<b>1.1.3. Morfología</b>	<b>22</b>
<b>1.1.4. El fruto</b>	<b>24</b>
<b>1.1.4.1. Calidad del fruto</b>	<b>25</b>
<b>1.1.4.2. Tamaño del fruto</b>	<b>25</b>
<b>1.1.4.3. Magulladuras</b>	<b>26</b>
<b>1.1.4.4. La mancha púrpura</b>	<b>28</b>

<b>1.1.5. Composición química</b>	<b>31</b>
<b>1.1.6. Propiedades medicinales</b>	<b>33</b>
<b>1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	<b>34</b>
<b>1.2.1. Clasificación</b>	<b>34</b>
<b>1.2.2. Su función en las plantas</b>	<b>36</b>
<b>1.2.3. Factores que afectan su composición</b>	<b>37</b>
<b>1.2.3.1. Factores internos</b>	<b>37</b>
<b>1.2.3.2. Factores agronómicos</b>	<b>38</b>
<b>1.2.3.3. Factores postcosecha</b>	<b>39</b>
<b>1.3. LA POLIFENOLOXIDASA (PPO)</b>	<b>40</b>
<b>1.3.1.1. Relevancia de PPO en frutos usados como alimentos</b>	<b>42</b>
<b>1.4. MÉTODOS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA</b>	<b>49</b>
<b>1.4.1 Inactivación de la enzima mediante calor</b>	<b>49</b>
<b>1.4.1.1 Escaldado</b>	<b>49</b>
<b>1.4.2 Inactivación de la enzima mediante inhibidores químicos</b>	<b>51</b>
<b>1.4.2.1 Anhídrido sulfuroso</b>	<b>51</b>
<b>1.4.2.2 Ácidos</b>	<b>52</b>
<b>1.4.2.3 Ácido ascórbico</b>	<b>52</b>

1.4.2.4	Otros inhibidores químicos	53
1.4.3	Eliminación del oxígeno	54
CAPÍTULO II		56
II.	MARCO METODOLÓGICO	56
2.1	POBLACIÓN Y MUESTRA	56
2.1.1	Población	56
2.1.2	Muestra	56
2.2	VARIABLES	56
2.2.1	Variable independiente	56
2.2.2	Variable dependiente	57
2.3	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	58
2.3.1	Equipos e Instrumentos de recolección de datos	58
2.3.1.1	Equipos e instrumentos	58
2.3.1.2	Materiales	59
2.3.1.3	Reactivos y soluciones	60
2.3.1.4	Materiales e Instrumentos para la recolección de datos	61
2.3.2	Métodos de Análisis	62
2.3.2.1	Análisis de humedad	62



<b>2.3.2.2</b>	<b>Análisis de Acidez Titulable</b>	<b>63</b>
<b>2.3.2.3</b>	<b>Análisis de Cenizas</b>	<b>64</b>
<b>2.3.2.4</b>	<b>Análisis de Proteína</b>	<b>65</b>
<b>2.3.2.5</b>	<b>Análisis de Grasa</b>	<b>67</b>
<b>2.3.2.6</b>	<b>Análisis de fibra</b>	<b>69</b>
<b>2.3.2.7</b>	<b>Análisis de Azúcares Reductores</b>	<b>70</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>72</b>
<b>2.4</b>	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>73</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Caracterización de la materia prima</b>	<b>73</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Descripción del diagrama de flujo para la obtención de pulpa de níspero</b>	<b>74</b>
<b>2.4.2.1</b>	<b>Recepción de materia prima</b>	<b>74</b>
<b>2.4.2.2</b>	<b>Selección y clasificación</b>	<b>74</b>
<b>2.4.2.3</b>	<b>Lavado y desinfección</b>	<b>74</b>
<b>2.4.2.4</b>	<b>Acondicionamiento</b>	<b>74</b>
<b>2.4.2.5</b>	<b>Inactivación enzimática</b>	<b>76</b>
<b>2.4.2.6</b>	<b>Pulpeado</b>	<b>76</b>
<b>2.4.2.7</b>	<b>Tamizado</b>	<b>76</b>
<b>2.4.2.8</b>	<b>Envasado</b>	<b>76</b>

2.4.2.9	Almacenamiento	77
2.4.3	Actividad de la polifenoloxidasas	77
2.4.3.1	Determinación de polifenoloxidasas en pulpa de níspero	77
2.4.3.2	Cuantificación proteica	77
2.4.3.3	Extracción de la enzima polifenoloxidasas	78
2.4.3.4	Separación de las enzimas polifenoloxidasas por Sephadex G-200.	78
2.4.3.5	Determinación de la actividad enzimática de polifenoloxidasas	79
CAPÍTULO III		80
III.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	80
3.1	Caracterización físico química del níspero	80
3.2	Actividad de la polifenoloxidasas en pulpa de níspero	82
3.3	Evaluación de los métodos de inactivación de la polifenoloxidasas	82
3.4	Evaluación estadística de los resultados de cada tratamiento en la actividad enzimática de la polifenoloxidasas	84
CAPÍTULO IV		90
IV.	CONCLUSIONES	90
CAPÍTULO V		91
V.	RECOMENDACIONES	91

<b>CAPÍTULO VI</b>	<b>92</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>92</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	<b>104</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Págs.</b>
Tabla 1 Níspero Composición por cada 100g de parte comestible cruda	32
Tabla 2 Diseño experimental de la evaluación de inactivación enzimática de pulpa de níspero	57
Tabla 3 Operacionalización de variables	58
Tabla 4 Análisis de varianza para los tratamientos	73
Tabla 5 Composición bromatológica del níspero en base a 100 g de porción Comestible	81
Tabla 6 Evaluación de polifenoloxidasa en pulpa de níspero con tratamientos de inactivación enzimática por análisis espectrofotométrico	83
Tabla 7 Homogeneidad de varianza	85
Tabla 8 Pruebas de efectos inter-sujetos para variable temperatura	85
Tabla 9 Prueba de comparaciones múltiples para los tratamientos	86
Tabla 10 Prueba de comparación de medias de tukey para subconjuntos Homogéneos	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1 Árbol de Níspero ( <i>Eriobotrya japonica</i> ), recuperado de Zappi y Turner (2001)	22
Figura 2 Hojas de Níspero ( <i>Eriobotrya japonica</i> ), recuperado de López (2017)	23
Figura 3 Fruto de Níspero ( <i>Eriobotrya japonica</i> ), recuperado de López (2010)	25
Figura 4 Frutos de Níspero japonés, cv. Algerie, afectados de mancha púrpura, recuperado de Gariglio, Juan, Almela y Agustí (2002)	28
Figura 5 Clasificación de compuestos fenólicos. A) Ácidos fenólicos (ácido caféico), B) Flavonoides (estructura general) y C) Taninos (condensados), recuperado de López (2010)	35
Figura 6 Reacciones de oxidación realizadas por polifenoloxidasas. A) cresolasa, B) catecolasa y C) lacasa. (Ramírez, Whitaker y Virador, 2003)	42
Figura 7 Reacción de pardeamiento enzimático y no enzimático (reacción de Maillard), recuperado de Sellés (2007)	45
Figura 8 Flujo de proceso para la obtención de pulpa de níspero, elaboración propia (2019)	75
Figura 9 Actividad enzimática en la pulpa de níspero después de la	

evaluación de los tratamientos, elaboración propia (2019)	83
Figura 10 Comparación de medias, Elaboración propia (2019)	88

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene por evaluar el efecto del ácido cítrico y ascórbico para reducir la actividad de la polifenoloxidasas en pulpa de níspero (*Eriobotrya japonica*); para ello se dispuso frutos de níspero adquiridos en el mercado mayorista Santa Celia de la provincia de Cutervo – Cajamarca. La parte experimental se dio inicio caracterizando fisicoquímica del níspero y se determinó la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en la pulpa de níspero antes de los tratamientos, luego se procedió a obtener la pulpa de níspero para evaluar los tratamientos (T1= 2% de ácido cítrico, T2= 2% de ácido ascórbico y T3= mezcla de ácido cítrico y ascórbico al 2%) y medir la actividad residual en cada uno de ellos. Los resultados de los tratamientos fueron analizados estadísticamente determinándose que el tratamiento 3 (mezcla de ácido cítrico y ascórbico al 2%, en igualdad de proporciones), fue el tratamiento que mitigo en mayor proporción la actividad de la polifenoloxidasas, encontrándose un valor residual de actividad igual a 22 UA/mg.

Finalmente se concluye que el sinergismo del ácido cítrico con el ácido ascórbico permite disminuir la actividad de la polifenoloxidasas retardando el pardeamiento enzimático de la pulpa de níspero y permitiendo una mayor vida útil.

**Palabras claves:** níspero, polifenoloxidasas, actividad enzimática

## ABSTRACT

The present research work has to evaluate the effect of citric and ascorbic acid to reduce the activity of polyphenoloxidase in loquat pulp (*Eriobotrya japon*); For that purpose, loquat fruits acquired in the Santa Celia wholesale market in the province of Cutervo - Cajamarca were available. The experimental part began by characterizing the physicochemical of the loquat and the enzymatic activity of the polyphenoloxidase in the loquat pulp was determined before the treatments, then the loquat pulp was obtained to evaluate the treatments (T1 = 2% citric acid , T2 = 2% ascorbic acid and T3 = mixture of citric acid and 2% ascorbic acid) and measure the residual activity in each of them. The results of the treatments were analyzed statistically, determining that treatment 3 (mixture of citric acid and 2% ascorbic acid, in equal proportions), was the treatment that mitigated the polyphenoloxidase activity in greater proportion, finding a residual activity value equal to 22 AU / mg.

Finally, it is concluded that the synergism of citric acid with ascorbic acid makes it possible to reduce the activity of polyphenoloxidase by delaying the enzymatic browning of loquat pulp and allowing a longer shelf life.

**Keywords:** medlar, polyphenoloxidase, enzymatic activity



## INTRODUCCIÓN

El níspero (*Eriobotrya japonica*) es un fruto asiático originario de China que más tarde fue introducido en Japón. Desde Japón las especies fueron introducidas al norte de India, Inglaterra y en el siglo XX al norte, centro y sur de América.

En México, el Níspero (*Eriobotrya japonica*) es una de las especies Frutícolas que actualmente tienen un gran potencial tanto comercial como económico, debido al aprovechamiento en la extracción de látex como materia prima para la elaboración de chicle y el establecimiento de huertos para el consumo de fruta y la exportación a Japón principalmente. La producción de Níspero alcanza las 10,128 toneladas (Chóez et al., 2010).

En Perú fue introducido por su fácil adaptación en climas subtropicales con temperaturas cálidas y por crecer en una amplia variedad de suelos, así como también por su carácter de aceptación convirtiéndose en un fruto propio especialmente de los valles interandinos, sierra norte (Cajamarca, Amazonas) y sierra centro (Ayacucho).

El Níspero (*Eriobotrya Japonica*) taxonómicamente pertenece a la familia de las Rosáceas, es un fruto comestible con agradables características organolépticas, que viene teniendo gran importancia en la industria alimenticia especialmente en el departamento de Ayacucho donde se elaboran productos derivados como Níspero en almíbar. En la Provincia de Cutervo el Níspero crece de forma silvestre y se comercializa mayormente en su estado natural.

El Níspero (*Eriobotrya japonica*) proporciona diferentes compuestos, entre ellos los fenólicos; estos compuestos han sido identificados como funcionales en el tratamiento de

diferentes enfermedades respiratorias, además también se les ha atribuido importantes actividades biológicas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Ito et al., 2002).

Los compuestos fenólicos resultan ser el sustrato perfecto para una enzima llamada polifenoloxidasas (PFO), la cual en presencia de oxígeno es capaz de oxidarlos y formar así pigmentos oscuros en la piel de los frutos, estas manchas representan pérdida en la calidad del fruto así como también pérdidas económicas para el comerciante (Ding et al., 2001).

En la actualidad existen diversos métodos desarrollados para controlar, minimizar o inhibir el proceso de pardeamiento enzimático para evitar la acción de la enzima polifenoloxidasas pero suelen ser preventivos, entre ellos tenemos: tratamiento térmico, congelación, liofilización, métodos químicos, etc.

Los métodos químicos consisten principalmente en la aplicación de antioxidantes. Existen diversos tipos de antioxidantes, entre los antioxidantes de origen natural se encuentran: el ácido ascórbico, lecitina, el alfa-tocoferol, derivados del ácido rosmarínico, etc. y entre los obtenidos por síntesis química destacan: butil-hidroxitolueno (BHT, E 321), butil-hidroxianisol (BHA, E 320), tertbutil-hidroquinona (TBHQ), etoxiquina (EQ), galato de propilo (E 310) y quelantes de metales como EDTA, ácido cítrico, etc. los cuales se asocian buscando un sinergismo o una potenciación.

Los antioxidantes son sustancias químicas que estando en concentraciones mucho más bajas que las de cualquier sustrato biológico oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato. Los compuestos antioxidantes poseen una estructura química apropiada para reaccionar fácilmente con un radical libre, tal que, como resultado de dicha interacción, estos

últimos pierden su reactividad y los antioxidantes se oxidan convirtiéndose en moléculas notablemente “más estables” hacia su entorno (Speisky, 2006). Los antioxidantes no funcionan indefinidamente. En el momento en que se saturan, ya no pueden captar más radicales libres y dejan de ser efectivos, pues el proceso de oxidación continúa. Simplemente estabilizan los radicales libres en lo que hemos denominado periodo de latencia. (Bueno, 2010)

Es así que en este trabajo se plantea como objetivo general, evaluar el efecto del ácido cítrico y ascórbico para reducir la actividad de la polifenoloxidasas en pulpa de níspero (*Eriobotrya japonica*) y los siguientes objetivos específicos: Evaluar las características físico-químicas de la pulpa de Níspero (*Eriobotrya japonica*), Determinar la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en la pulpa de níspero, Determinar el mejor tratamiento que permita reducir la actividad enzimática de la polifenoloxidasas y Determinar la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en la pulpa de níspero (*Eriobotrya japonica*), en el mejor tratamiento.

## **CAPÍTULO I**

### **I. FUNDAMENTO TEÓRICO**

#### **1.1 NÍSPERO**

##### **1.1.1 Origen**

El primer cultivo de níspero procede del país de Japón. En aquel entonces se cultivaba una especie de níspero más pequeña que la actual, pero igualmente nutritiva y con muy buen sabor. Los nísperos japoneses viajan por todo Sudamérica hasta México, y se cree que es en el año 1500 cuando los españoles al mando de los marinos mercantes llevan el níspero hasta España por primera vez, tras conquistar la ciudad azteca de Tenochtitlan. Está muy claro, pero sus propiedades y su buen sabor sí que se hacen constar en un documento italiano del año 1544 que menciona al níspero. Pero no todos los comentarios fueron positivo sobre el níspero, fue a finales de los años 60 y principios de los 70 cuando comenzó a desarrollarse el cultivo intensivo de este árbol, al implantarse las variedades y técnicas de cultivo actualmente utilizadas (López, 2017).

Hoy día, es un frutal cuyo cultivo está muy extendido en todo el mundo tanto por su valor ornamental como por sus apreciados frutos. El níspero fue introducido en España por marinos mercantes en Sagunto (Valencia), hace más de dos mil años, y de aquí se extendió por toda la Península Ibérica, encontrando el mejor hábitat para su propagación y desarrollo en zonas del litoral Mediterráneo, en Almuñecar (Granada), en Callosa d'En Sarria (Alicante), región donde los nísperos gozan de Denominación de Origen y en Málaga (Mapama, 2015). Es una

baya y pertenece al grupo de las frutas con sus semillas en el interior, igual que una manzana, pero su comportamiento es el de una fruta.

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica*) es un frutal con más de 2000 años de cultivo (Lin, 2007). Los datos más recientes indican que es una especie nativa de la región media y baja del río Dahube y de las montañas Gongga en el Sudeste de China (Márquez *et al.*, 2009). Una de las primeras referencias del cultivo del níspero es un documento escrito en China y datado entre el 502 y el 506 de la era moderna, referido a la localidad china de Tedote. No obstante, hay que remontarse al año 1690 para encontrar la primera descripción completa del níspero. Esta descripción fue realizada por el botánico alemán, Engelbert Kaempfer.

### **1.1.2 Taxonomía**

El níspero del Japón, tiene la siguiente clasificación botánica según Castro y Pinto (2008):

División	: <i>Angiosperma</i>
Clase	: <i>Magnoliatae</i>
Orden	: <i>Rosales</i>
Familia	: <i>Rosaceae</i>
Género	: <i>Eriobotrya</i>
Especie	: <i>Eriobotrya japónica</i>

### 1.1.3 Morfología

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica*) es un árbol vigoroso, productivo, de buen porte (3-10 mts de altura) (Delucchi, 2010) y de rápida entrada en producción (2-3 años), figura 1. Se considera como fruta no climatérica (Wang *et. al.*, 2010), por ello se recolecta una vez madurado en el árbol. En este estado de desarrollo la textura del fruto es frágil y susceptible de deformaciones por causas mecánicas y bioquímicos en su etapa de pos cosecha. El período de vida útil tras la recolección es muy corto, como consecuencia de su alta susceptibilidad a la pérdida de agua, el pardeamiento de la pulpa y el ataque por hongos.



Figura 1 Árbol de Níspero (*Eriobotrya japonica*), recuperado de Zappi y Turner (2001)

El níspero presenta ramas principales gruesas y cortas, con entrenudos relativamente largos y de color gris claro. Las ramas se hallan generalmente desprovistas de hojas, salvo en sus extremos. El sistema radical es ramificado, somero y de notable fuerza de penetración. La raíz principal es pivotante y alcanza como máximo 2.5 m de profundidad; las secundarias

están muy ramificadas superficialmente, llegando hasta 25 cm de profundidad, sobrepasando en su expansión unos 30 cm del perímetro de la zona de goteo.

Las hojas son simples, alternas persistentes con un color verde intenso en su parte superior y castaño en la inferior (Delucchi, 2010) como se ve en la figura 2, cabe mencionar que la consistencia coriácea de las hojas resulta perjudicial para el aspecto del fruto pues la simple rozadura causada por el desplazamiento de las hojas por el viento produce manchas marrones, típicas del pardeamiento enzimático. El tamaño y grosor de las hojas de los árboles adultos tienen una relación directa con las dimensiones de los racimos de flores y el volumen de los frutos, de ahí que solo se cultiven variedades de hojas grandes.



Figura 2 Hojas de Níspero (*Eriobotrya japonica*), recuperado de López (2017)

Las flores del níspero se distribuyen en panículas terminales de longitud de 10 a 19 cm y forma piramidal. Cada panícula consta de un eje principal en el que se insertan de cinco a

diez brazos que contienen un número variable de flores. Las flores son pequeñas, de pétalos blancos y cáliz color café pubescente (Fonfría, 2010).

#### **1.1.4 El fruto**

El níspero generalmente contiene del 65-70% de pulpa, del 16-19% de semilla y 8-9% de cáscara. Su peso es aproximadamente de 15-80 g (Ding, Chachin, Ueda, Imahori y Wang, 2001).

Tiene forma ovoide o globosa, de color amarillo-anaranjado brillante, con un ligero sabor ácido agradable, textura no muy blanda en cuyo interior se encuentra de dos a cuatro semillas, cubierta con una pulpa carnosa y coloreada, el tamaño del fruto es de tres a cinco centímetros de longitud y un peso que oscila entre los 30 y 50 g (Castro y Pinto, 2008).

Los frutos del níspero japonés son pomos de pequeño tamaño, son de forma redondeada, ovalada o elíptica como se aprecia en la figura 3. El color de la piel de los frutos va desde el amarillo pálido al anaranjado intenso, y el color de la pulpa desde el blanco al naranja, pasando por diversos tonos de amarillo. La piel del fruto es dura y fina y está cubierta por un vello gris que, al madurar, forma una pubescencia blanca muy tenue y frágil (Fonfría, 2010). El fruto contiene generalmente entre una y cinco semillas, a veces más grandes y marrones, que representan hasta el 50% del volumen del pomo, pero sólo un 15% del peso.





Figura 3 Fruto de Níspero (*Eriobotrya japonica*), recuperado de López (2010)

#### **1.1.4.1 Calidad del fruto**

Como para la mayoría de las especies frutales cuyo destino es el consumo en fresco, la calidad del níspero japonés se basa en sus características intrínsecas, organolépticas y aspecto externo, sobre todo la forma, tamaño, color y ausencia de lesiones. El tamaño final que adquiere el fruto, la ausencia de magulladuras y de mancha púrpura, como desorden fisiológico, son tres de los aspectos valorados por el consumidor y por tanto son problemas importantes a los que se enfrentan los cultivadores (Sellés, 2007).

#### **1.1.4.2 Tamaño del fruto**

El tamaño que alcanza el fruto en la madurez no es generalmente aceptable, de acuerdo con la demanda del mercado. Esta falta de tamaño comercial es debida a la competencia por

carbohidratos que se establece entre los frutos que inician el desarrollo hasta la maduración, por lo que el aclareo de frutos es una práctica habitual para incrementar su tamaño (Lin, Sharpe y Janick, 1999). Esta práctica es efectiva pero supone entre un 25-30% de los costes del cultivo. También puede mejorarse el tamaño del fruto mediante el rayado de ramas para mejorar la disponibilidad de carbohidratos (Agustí, Juan, Almela, Andreu y Speroni, 1997) y mediante la aplicación de reguladores de crecimiento como auxinas de síntesis que mejoran el tamaño por un efecto directo sobre su desarrollo (Agustí, Juan, Almela, Andreu y Speroni, 1997).

#### 1.1.4.3 **Magulladuras**

El níspero es un fruto no climatérico y por ello se recolecta una vez madurado en el árbol. En este estadio de desarrollo la textura del fruto es frágil y susceptible de deformaciones por causas mecánicas.

La consistencia coriácea de las hojas resulta perjudicial para el aspecto del fruto pues la simple rozadura causada por el desplazamiento de las hojas por el viento produce manchas marrones, típicas del pardeamiento enzimático. Para paliar este problema se recurre cada vez más al cultivo bajo malla, reduciendo considerablemente el efecto del viento y produciendo, además, mayor uniformidad en la floración y maduración de los frutos, con el consecuente ahorro de mano de obra. Sin embargo, el cultivo bajo malla altera las condiciones ambientales de temperatura y humedad, que provocan la falta de cuajado en algunas variedades.

El grado de manipulación del níspero desde su recolección hasta su presentación al consumidor es bastante elevado, lo cual aumenta el riesgo de daños mecánicos. Su textura frágil unida a una piel fina y poco pigmentada y una pertinaz actividad polifenol oxidasa son la causa de la manifestación de magulladuras o zonas de decoloración parda y textura blanda a las pocas horas de sufrir daños mecánicos.

Las magulladuras se originan por fuerzas de compresión, impacto y abrasión. La magulladura por impactos es el resultado de caídas, rebotes o choques, la de compresión ocurre cuando las cajas están demasiado llenas y los frutos son apretados unos contra otros y la de abrasión resulta de la fricción de un fruto contra otro o contra las superficies del contenedor (Day, 1992). Cualquiera de estos daños, cambian la textura o el color del tejido, debido a la destrucción de los compartimentos celulares del fruto, que permiten que los sustratos de naturaleza fenólica sean accesibles a la enzima polifenol oxidasa, dando lugar a polímeros oscuros. En general, todos los tipos de magulladura resultan de una inapropiada manipulación o inadecuado embalaje. En el caso específico de la magulladura de impacto la incidencia de la severidad dependerá de la altura en que el fruto se deja caer y del tipo de superficie de impacto (Crisoto, Andris, y Mitcham, 1993; Crisoto, Garner, Ritenour, Schap y Rushing, 1996). Cualquier daño mecánico puede incrementar la tasa de respiración y producción de etileno lo que conlleva a una aceleración en la maduración del fruto, ablandamiento, pérdida de agua y deterioro general de los frutos (Crisoto, Andris, y Mitcham, 1993). Además, el daño por impacto causa heridas superficiales en el fruto lo que facilita la entrada de microorganismos y desarrollo de putrefacciones (Crisoto, Garner, Ritenour, Schap y Rushing, 1996).

#### 1.1.4.4 La mancha púrpura



Figura 4 Frutos de Níspero japonés, cv. Algerie, afectados de mancha púrpura, recuperado de Gariglio, Juan, Almela y Agustí (2002)

La mancha púrpura es el problema principal que presenta este cultivo de forma general para todas las zonas cultivadas, y en particular en Alicante, (figura 4). La mancha púrpura del níspero (o mancha morada) es una alteración fisiológica frecuente que afecta a la epidermis del fruto, produciendo manchas pardo-violetas más notorias en la parte expuesta al sol que desmerecen su calidad comercial sin que se observen síntomas en otros órganos de la planta (Ojima, Rigitano, Simao y Ique, 2006). En España se considera que daña el 15% de la producción afectando al precio del fruto en un 40-50%. La coloración morada que caracteriza esta fisiopatía, es el resultado de una oxidación en el tejido subcuticular del fruto, con

frecuencia en la zona de elongación del fruto, en la que participa la enzima polifenol oxidasa (Tuset, Rodríguez, Boronad, García y Monteagudo, 1989).

Los síntomas de la alteración aparecen en el momento del cambio de color del fruto, cuando los frutos empiezan a virar de color verde al verde-amarillento (Tuset, Rodríguez, Boronad, García y Monteagudo, 1989) y se agrava cuando el crecimiento del fruto coincide con temperaturas diarias muy bajas (Gariglio *et. al.*, 2003a). La aparición de la fisiopatía en un momento puntual hace pensar en una fuerte influencia de los factores endógenos del fruto como la transpiración cuticular, composición mineral, concentración de azúcar y relaciones hídricas. Sin embargo, estudios recientes (Gariglio, Juan, Almela y Agustí, 2002) han demostrado que no existen diferencias en la transpiración cuticular entre frutos sanos y afectados y por ello la pérdida de agua no puede ser la causa del desorden.

Cuando los frutos de níspero presentan sintomatología de mancha púrpura, las células del tejido afectado aparecen deshidratadas con el citoplasma colapsado y su contenido celular fuera del plasmalema (Gariglio, Juan, Almela y Agustí, 2002). La lesión empieza en las células hipodérmicas más profundas próximas a las células más externas de la pulpa y cuando los síntomas aumentan, se incrementan el número de células epidérmicas implicadas, alcanzando en estados severos toda la epidermis excepto la cutícula que permanece intacta (Gariglio, Juan, Almela y Agustí, 2002).

La alteración aparece durante todo el periodo de cosecha, pero es proporcionalmente más intensa al inicio de la misma. Debido a esto los sistemas de cultivo tendentes a exaltar la precocidad, de gran interés desde el punto de vista económico, son los que promueven una

afección mayor. Además, está comprobada la influencia del sol sobre la aparición de la lesión, así como el exceso de abono nitrogenado y el uso de prácticas tendentes a aumentar el tamaño del fruto, mediante técnicas de aclareo (Gariglio, Castillo, Juan, Almela y Agustí, 2003b). Hasta el presente, el origen más aceptado de la mancha púrpura es una deficiencia localizada de calcio en el fruto (Caballero, 1993; Tuset, Rodríguez, Boronad, García y Monteagudo, 1989), sin embargo, la concentración de calcio en el fruto y epidermis no muestra diferencias entre frutos sanos y dañados (Gariglio, Juan, Almela y Agustí, 2002), observándose diferencias en otros elementos como K, Fe y Cu, los cuales presentan mayor concentración en frutos afectados por este desorden. Además de la carencia de este macronutriente, la alteración puede deberse a una deficiencia de dos micronutrientes, Cu y Zn o debido a una excesiva acidificación del fruto (Casado-Vela, Sellés, Gómez-Lucas y Bru, 2003a).

Por otra parte, el contenido en azúcares se ha relacionado con este desorden (Gariglio, Castillo, Juan, Almela y Agustí, 2003b), observándose una concentración de sacarosa superior al 25% en frutos afectados (Gariglio, Martínez-Fuentes, Mesejo y Agustí, 2005). Además, se ha reforzado la hipótesis de que el desorden aparece como consecuencia de un desequilibrio entre el contenido de agua presente en la pulpa y la epidermis causado por la diferente habilidad de los tejidos para acumular azúcar. Para mejorar la retención de agua en la epidermis y evitar la deshidratación celular se han aplicado diferentes compuestos minerales (nitrato de calcio, cloruro de calcio, nitrato de amonio, nitrato de potasio) durante las dos semanas anteriores al cambio de color observándose una mayor retención de agua en la epidermis (Gariglio, Martínez-Fuentes, Mesejo y Agustí, 2005). Estos resultados,

refuerzan la hipótesis de un mejor control del desorden como consecuencia de un efecto general de sales minerales sobre la relación de agua entre la epidermis y pulpa, más que un efecto específico debido a un catión.

#### **1.1.5 Composición química**

Se ha demostrado la presencia de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa en níspero, la concentración aumenta a lo largo de la maduración con excepción de la maltosa, ya que desaparece cuando el fruto ya ha madurado. De los azúcares presentes en níspero maduro los más sobresalientes son la fructosa, sacarosa y glucosa. Y de los ácidos el más representativo es el ácido málico con 89% del total de los ácidos presentes, aunque también se ha reportado la presencia en pequeñas cantidades de ácido cítrico, tartárico y succínico (Nagy y Shaw, 2000).

Hall, Smoot, Knight y Nagy (2008), analizaron el níspero fresco y encontraron 0,42 g de proteína por cada 100 g de fruto. De los 10 aminoácidos indispensables el más abundante fue la leucina, mientras que de los aminoácidos no indispensables se encontraron 8 siendo el ácido glutámico y ácido aspártico los más sobresalientes y un nivel alto de prolina.

El contenido de vitaminas y minerales presentes en níspero se enlistan en el Cuadro1. Las dos vitaminas más estudiadas son la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina A (-caroteno). El contenido de ácido ascórbico en el níspero provee menos del 10% de la cantidad diaria recomendada por la FDA (Food and drug administration), mientras que la cantidad de

carotenoides es más del 100% de lo recomendado ingerir diariamente para esta vitamina (Nagy y Shaw, 2000).

Tabla 1

*Níspero Composición por cada 100g de parte comestible cruda*

Nutriente	Cantidad por 100g de pulpa de fruto fresco
Energía	47,0 kcal
Proteínas	0,430 g
H. de c.	10, 4 g
Fibra	1,70 g
Vitamina A	153 µg ER
Vitamina B1	0,019 mg
Vitamina B2	0,024 mg
Niacina	0,263 mg
Vitamina B6	0, 100 mg
Folatos	14, 0 µG
Vitamina B12	---
Vitamina C	1,0 mg
Vitamina E	0,890 mg EαT
Calcio	16,0 mg
Fosforo	27,0 mg
Magnesio	13,0 mg
Hierro	0,280 mg
Potasio	266 mg
Cinc	0,050 mg
Grasa total	0,200 g
Grasa saturada	0,040 g
Colesterol	---
Sodio	1,00 mg

Nota. Pamplona (2003)



Del contenido mineral cabe resaltar el alto nivel de potasio, este se presenta en jugo de naranja, mismo que es recomendado como fuente terapéutica para pacientes tratados con diuréticos. Por ello el níspero pudiera considerarse como una alternativa al jugo de naranja para pacientes que no toleran jugos cítricos. Así el níspero podría proveer una porción sustancial de potasio sugerido para una dieta saludable. Otros minerales importantes son el calcio y el magnesio que, si bien están presentes, las cantidades no son suficientes para ser consideradas fuentes significativas de estos minerales. La FDA también ha establecido la ingesta de otros minerales tales como zinc, hierro y fósforo, todos ellos presentes en níspero, aunque en pequeñas cantidades (Nagy y Shaw, 2000). Además de los minerales y vitaminas presentes en el níspero contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales están ampliamente distribuidos en las plantas (Ding, Chachin, Ueda, Imahori y Wang, 2001).

#### **1.1.6 Propiedades medicinales**

Luck (2000), el níspero es un fruto que por su composición química presentan diferentes propiedades medicinales, entre las principales tenemos:

- Rebaja el nivel de colesterol
- Ejerce acciones astringentes, reguladoras y tonificantes sobre las mucosas intestinales.
- Posee efecto diurético y antidiarreico
- En las enteritis ejerce una acción antiinflamatoria, lo que la adecua para estómagos delicados.

- Por su alto contenido en potasio y su pobreza en sodio es muy útil en dietas para personas con problemas de peso, dado que además su contenido calórico es bajo.
- La inclusión del níspero en la dieta de los enfermos con problemas cardiovasculares, es muy aconsejable debido a la composición en pectina y su beneficiosa acción protectora.

## **1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS**

### **1.2.1 Clasificación**

Los fenoles son caracterizados por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos. Hasta la fecha se han reportado 8000 estructuras fenólicas que están ampliamente distribuidas en el reino plantae y muchas de ellas se encuentran en los alimentos. Los compuestos fenólicos pueden ser simples, de bajo peso molecular, con un solo anillo aromático hasta largos y complejos taninos. Estos compuestos pueden ser clasificados de acuerdo al número y arreglo de sus átomos de carbono y comúnmente se encuentran conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. El azúcar unido puede ser un mono-, di-, ó menos frecuente un polisacárido y estar formado por unidades de hexosa y pentosa. La glicosidación aumenta la solubilidad de las agliconas en agua, aumentando su movilidad y facilidad de transporte dentro de la planta. (Crozier, Jaganath y Clifford, 2009).

Los polifenoles son clasificados en tres grupos importantes: ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Figura 5). Los ácidos fenólicos incluyen hidroxibenzóico ( $C_6-C_1$ ), hidroxifenilacetico ( $C_6-C_2$ ) e hidroxicinámico ( $C_6-C_3$ ) (Figura 5A). Los ácidos hidroxicinámicos son los más ampliamente distribuidos en tejidos de plantas, los más

importantes son p-cumárico, felúrico y el ácido cinámico. Sin embargo son raramente encontrados en la naturaleza en estado libre (Shahid y Naczk, 2004).

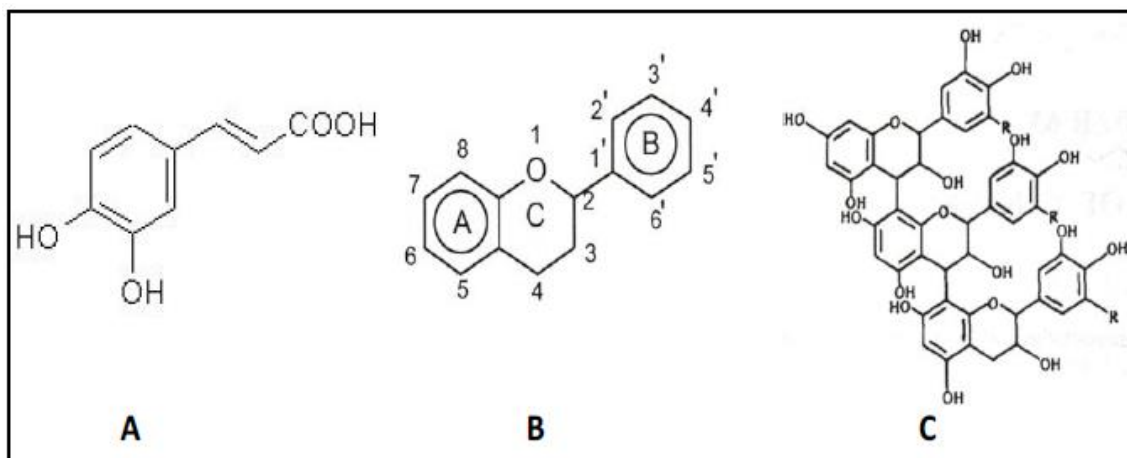


Figura 5 Clasificación de compuestos fenólicos. A) Ácidos fenólicos (ácido caféico), B) Flavonoides (estructura general) y C) Taninos (condensados), recuperado de López (2010)

Los flavonoides tienen una estructura común de difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ), consistiendo en dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos que son usualmente formados por un anillo heterocíclico oxigenado como se observa en la Figura 5B. Su estructura permite una clasificación de flavonoides incluyendo: antocianinas, flavanoles, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas y sus derivados. Las antocianinas son pigmentos solubles en agua responsables de los colores rojo, morado y azul en frutas y flores. Muchos de los flavonoides excepto flavan-3-ols, son usualmente glicosilados en alguno de los grupos hidroxilos unidos a residuos de azúcares tales como: glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa (Shahid y Naczk, 2004). Los taninos son compuestos polifenólicos de alto peso molecular que reaccionan naturalmente con proteínas, pueden formar complejos con proteínas los cuales son responsables del sabor conocido como astringente, causado por la precipitación de proteínas

(Figura 5C). Los taninos son típicamente clasificados en tres grupos: (1) taninos condensados (procianidinas o proantocianidinas), (2) taninos hidrosolubles y (3) florotaninos (Shahid y Naczki, 2004).

### **1.2.2 Su función en las plantas**

Los compuestos fenólicos juegan un importante papel en la apariencia visual de alimentos. Las antocianinas son pigmentos responsables de la mayoría de tonos azules, morados, rojos y en algunos productos básicos negro. Generalmente un aumento en la pigmentación por antocianinas es considerado un atributo positivo en frutos principalmente. Sin embargo, en algunos casos la pigmentación de antocianinas es no deseada como es el caso de espárragos en los que la pigmentación con antocianinas es considerada para tener un impacto negativo en su calidad. Compuestos fenólicos tales como monohidroxifenoles y ortodihidroxifenoles son sustratos para las polifenoloxidasas de plantas, enzimas que producen polímeros oscuros y llevan a la pérdida de calidad. Esto es especialmente importante en frutos y vegetales frescos (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Los compuestos fenólicos son también relevantes en términos de sabor de los alimentos, pueden proporcionar sabores amargos, dulces, astringentes o aromas astringentes. Algunos compuestos fenólicos son intensamente amargos como en el caso de la flavanona neoesperidósido característica de algunos productos cítricos (uva, naranjas, limón). Estos compuestos después de una transformación química son intensamente dulces y a veces son usados como intensificadores de sabor o aroma. Otros fenólicos son pungentes y

responsables del sabor característico de algunas especias como la capsaicina en el pimentón (Horowitz y Gentili, 1999). Los fenoles simples especialmente aquellos que son volátiles contribuyen al aroma. Algunos ejemplos son la vainillina, isoeugenol y eugenol. Algunos de ellos son precursores de aromas debido a que están en forma fenoles glicósidos, que después de la hidrólisis liberan el fenol que da origen al aroma (Crouzet, Sakho y Chassagne, 1997). La estructura de taninos encontrada en la dieta humana está dividida en dos grandes grupos. El primer grupo comprende el éster ácido elágico de glucosa, conocido como elagitaninos, encontrados principalmente en frutos de la familia Rosaceae. El segundo grupo estructuralmente se basa en un esqueleto flavonol, incluyendo taninos condensados oligoméricos y monómeros asociados, estos son encontrados en muchos frutos, leguminosas, cerveza, sidra y vino. En un estudio realizado por Tomás-Barberán y Espín (2001), sugirieron que el entrecruzamiento de proteínas salivares y taninos es esencial para su eficiente precipitación y así poder ser astringente.

### **1.2.3 Factores que afectan su composición**

#### **1.2.3.1 Factores internos**

El contenido cuantitativo como cualitativo de fenólicos en plantas depende de su información genética. El uso de compuestos fenólicos en plantas como marcadores taxonómicos está bien documentado, porque según la especie de planta hay fenólicos característicos cuyo análisis puede ser usado para establecer afinidades taxonómicas o diferencias. Existen reportes donde muestran claramente el diferente contenido de fenólicos en varias especies del mismo género y en diferentes cultivares de la misma especie (García-Viguera, Tomás-Barberán, Ferreres, Artés y Tomás-Lorente, 1993).

La susceptibilidad al oscurecimiento asociado con la actividad de PFO varía considerablemente en algunas plantas. Lo que ha tenido un gran interés y ha llevado a la realización de investigaciones sobre el tema, en las que se encontró que las actividades de PFO y peroxidasa (PER) dependen del cultivar y tejido de la planta, y con ello poder considerar nuevas estrategias para prevenir el oscurecimiento enzimático (Haruta *et. al.*, 1998). La inducción de la enzima Fenilalanina amino liasa (PAL) es esencial para la acumulación de diferentes compuestos fenólicos en la planta. Que al igual que la PFO y la PER pueden encontrarse en diferentes tejidos con diferentes propiedades cinéticas y físicas (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

#### **1.2.3.2 Factores agronómicos**

El medio ambiente también juega un papel importante en la composición de fenoles de frutos y vegetales. La disponibilidad del agua y composición del suelo tienen un marcado efecto en el contenido de fenoles en plantas, y en la capacidad de sufrir oscurecimiento y otros desórdenes fisiológicos que aparecen durante el periodo en el que la planta está en el campo. Substancialmente la disponibilidad del boro afecta el contenido de fenoles. Los metales pesados inducen la actividad de PER con la aparición de isoenzimas incrementando con ello la susceptibilidad al oscurecimiento. La presencia de betainas y calcio en el suelo induce metabolismo de fenoles y acumulación de antocianinas (Yokotsuka, Nagao, Nakazawa y Sato, 1999).

La temperatura (o más correctamente, la diferencia entre temperaturas de día y noche), puede tener también efecto en la acumulación de pigmentos de antocianinas en la piel de manzana

(Tomás-Barberán y Espín, 2001). La irradiación del sol también tiene algunos efectos en la pigmentación de antocianinas, se ha demostrado que frutos localizados en la parte externa del árbol como reciben luz solar directamente, hay más acumulación de antocianinas en la cáscara del fruto, mientras que en los que se localizan bajo la sombra del árbol, el desarrollo de pigmentos es menor (Gil, García-Viguera, Artés y Tomás-Barberán, 1995).

Factores ambientales y prácticas agronómicas tales como irrigación (Sannomaru, Katayama, Kashimura y Kaneko, 1998), fertilización (Misra, Sukumaran, y Verma, 1991) y estrés por sales (Sancho, Milrad de Forchetti, Pliego, Valpuesta y Quesada, 1996) también afectan actividades de PFO y PER y por consiguiente la calidad de los frutos y vegetales. El efecto puede ser positivo o negativo dependiendo de la enzima, ya que un incremento en la actividad de PFO y PER resulta perjudicial para los fenoles porque son oxidados, pero un incremento en la actividad de PAL podría ser benéfico ya que hay una mayor producción de fenoles (Barth, Weston y Zhuang, 1995).

### **1.2.3.3 Factores postcosecha**

La manipulación de frutos y vegetales durante la cosecha, transporte y almacenamiento poscosecha, tiene un importante impacto sobre compuestos fenólicos y enzimas involucradas con su metabolismo, sufriendo cambios en la calidad que a menudo decrece. Una estrategia natural para evitar la oxidación fue la separación de enzimas oxidativas y sustratos potenciales. Sin embargo, por daños mecánicos la célula se rompe y empieza toda una cascada de eventos incluyendo la activación de la PFO que provoca la oxidación de compuestos fenólicos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). El almacenamiento a bajas

temperaturas puede tener efectos sobre los fenoles tanto positivos como negativos, lo que va a depender del tipo de fruto y la temperatura de almacenamiento. En tejidos de plantas rojas a bajas temperaturas el contenido de antocianinas se incrementa. También a bajas temperaturas en otros se incrementa el contenido de derivados de ácidos hidroxicinámicos (Kalt, Forney, Martin y Prior, 1999).

La presencia de etileno (la hormona de maduración) en la atmósfera circundante y el almacenamiento refrigerado producen efectos negativos sobre los fenoles, ya que se presentan desórdenes fisiológicos manifestándose en la formación de manchas oscuras en los frutos y vegetales (Price, Bacon y Rhodes, 1997). La acumulación de etileno por senescencia induce la síntesis de nuevas isoenzimas de peroxidasa y provoca un incremento en su actividad total, además promueve la actividad de polifenoloxidasas (Couture, Cantwell, Ke y Saltveit, 1993).

### **1.3 La polifenoloxidasa (PPO)**

La polifenoloxidasa (PFO), es conocida también como tirosinasa, fenolasa, catecol oxidasa, catecolasa, o-difenol oxidasa, monofenol oxidasa y cresolasa, el problema con su nombre es que puede actuar sobre dos tipos generales de sustratos. La cresolasa (EC. 1.14.18.1) es capaz de hidroxilar monohidroxifenoles en la posición orto con respecto al grupo hidroxilo original (Figura 6A), mientras que la catecolasa (EC 1.10.3.2) oxida a o-hidroxifenoles como el catecol removiendo los hidrógenos de los grupos hidroxilo formando benzoquinonas (Figura 6B) (Ramírez, Whitaker y Virador, 2003).



La primera enzima puede también ser referida como una monofenol oxidasa y la segunda como una o-difenol oxidasa. Las monofenol oxidasas generalmente también actúan como o-difenol oxidasa a menudo a ritmo más rápido, por lo tanto, algunas veces se les clasifica con cualquiera de los dos nombres, sin embargo, no todas las o-difenol oxidasas pueden actuar como monofenol oxidasas. Las benzoquinonas formadas por o-difenol oxidasas son muy reactivas con  $O_2$ , compuestos sulfidrilo, aminas, aminoácidos y proteínas, que al reaccionar con ellas se forman una gran variedad de compuestos incluyendo melaninas con colores rojo, amarillo, café y negro (Ramírez, Whitaker y Virador, 2003). Un tercer tipo de reacción de polifenoloxidasa ocurre con la lacasa (EC 1.10.3.2) actuando en p-dihidroxi compuestos, pero no exclusivamente para dar compuestos coloreados (Figura 6C). Las lacasas son también enzimas que contienen cobre, pero el mecanismo de oxidación difiere de las o-difenol oxidasas, ya que el sustrato específico para estas enzimas es el p-fenilendiamina (Ramírez, Whitaker y Virador, 2003).

El oscurecimiento enzimático es causado por la oxidación de sustratos fenólicos por la polifenoloxidasa y como resultado de esta oxidación es la formación de quinonas reactivas. Estas quinonas que son especies altamente reactivas están involucradas en diferentes líneas de reacción. Pueden ser poderosos electrófilos y sufrir ataque nucleofílico, por otros polímeros como aminoácidos y proteínas y formar pigmentos oscuros durante la senescencia o pos-cosecha y frutos y vegetales. Sin embargo, la polifenoloxidasa es localizada en los cloroplastos, mientras que los fenólicos están almacenados en las vacuolas de tejidos sanos. Por lo tanto, el oscurecimiento es iniciado únicamente cuando existe una disrupción fisiológico o accidental de los tejidos (*Liu et. al.*, 2007).

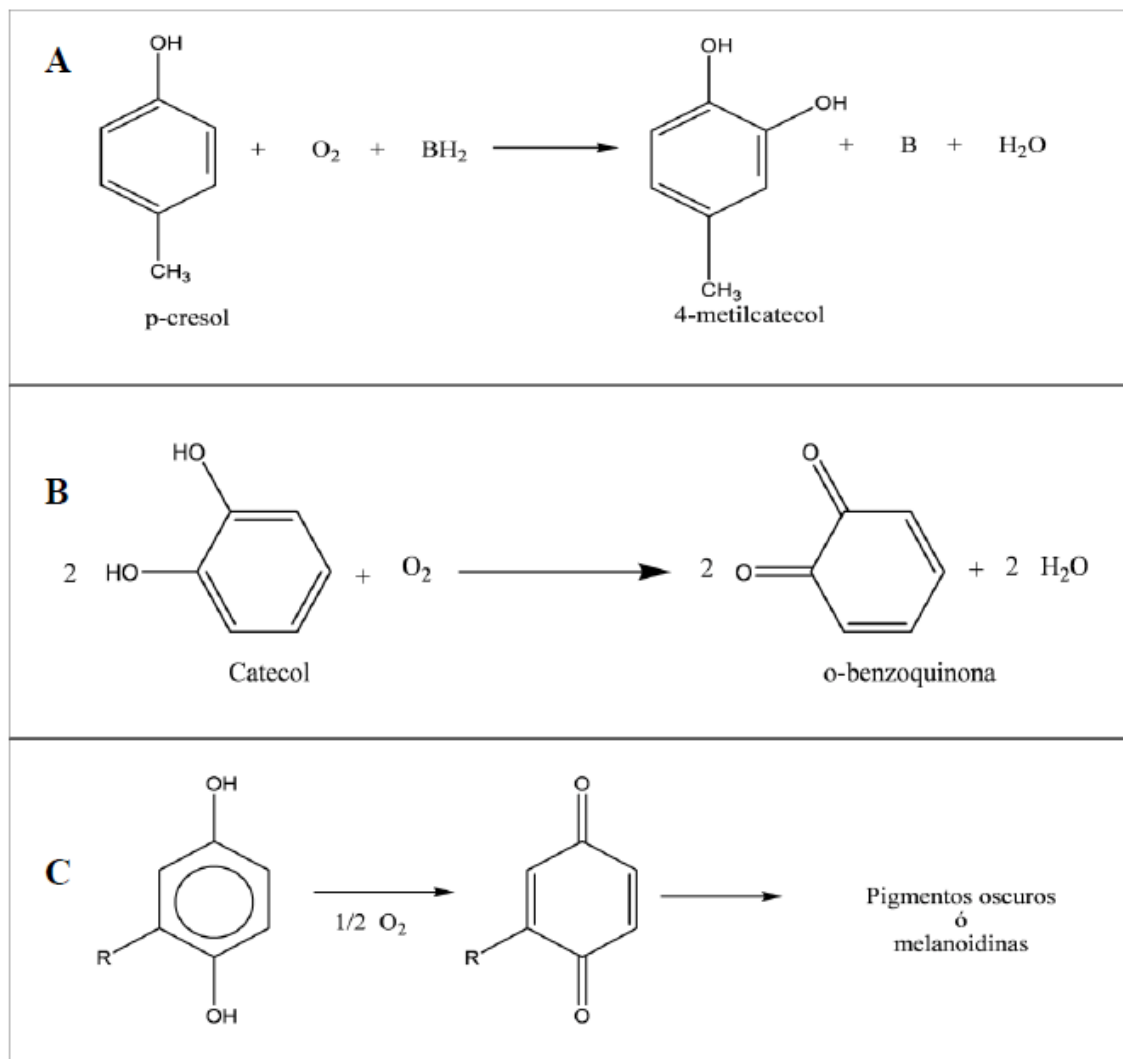


Figura 6 Reacciones de oxidación realizadas por polifenoloxidasas. A) cresolasa, B) catecolasa y C) lacasa.  
 (Ramírez, Whitaker y Virador, 2003)

### 1.3.1.1 Relevancia de PPO en frutos usados como alimentos

El fenómeno de pardeamiento de frutos y vegetales durante el crecimiento, recogida, almacenamiento y procesado, es un problema de primera magnitud en la industria alimentaria y se reconoce como una de las principales causas de pérdidas de calidad y valor comercial.

Este pardeamiento produce cambios importantes tanto en la apariencia (colores oscuros) como en las propiedades organolépticas (sabor, textura) de vegetales comestibles (Mayer, 1987), y además suele ir asociado al desprendimiento de olores y efectos negativos sobre el valor nutricional (Amiot, Tacchini, Aubert y Nicolas, 1992; Chen, Berenbaum, Zangerl y Engeseth, 2000).

Las reacciones de oxidación que provocan el pardeamiento de frutos y vegetales son de origen enzimático y están catalizadas principalmente por la enzima polifenol oxidasa (PPO), siendo su actividad particularmente alta en aquellos frutos y vegetales que contienen niveles altos de compuestos polifenólicos (Amiot, Tacchini, Aubert y Nicolas 1992).

En el procesamiento de alimentos suele ser una actividad perniciosa, pues en contacto con el aire cataliza la oxidación de los compuestos fenólicos naturales a sus correspondientes quinonas, y éstas evolucionan de forma espontánea hacia diferentes pigmentos que producen el pardeamiento de los frutos, provocando un aspecto desagradable frente al consumidor y considerables pérdidas económicas. Esta es la razón fundamental por la que el contenido de fenoles y polifenol oxidasa se consideran determinantes para evaluar la calidad de frutos y vegetales (Lee y Whitaker, 1995; Tomás-Barberán y Espín, 2001). El níspero no es una excepción, y los fenómenos de pardeamiento asociados a magulladuras, mancha púrpura y maduración están relacionados con la PPO.

En plantas existe una gran cantidad y diversidad estructural de compuestos fenólicos pertenecientes a diversas familias como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, ligninas y flavonoides. Estos compuestos desempeñan funciones importantes en las plantas, siendo las más relevantes las de protección frente a radiación ultravioleta y frente a condiciones de

estrés biótico gracias a las propiedades antimicrobianas de los propios compuestos fenólicos y mediante sellado de heridas por lignificación (Hermann, 2006; Ke y Salveit, 2008; Macheix, Sapis y Fleuriet., 1991).

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 post-cosecha de los mismos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Además, para una misma especie el contenido de fenoles es dependiente de la variedad (Ding, Chachin, Ueda y Mochioka, 1998a; Ding, Chachin, Ueda, Imahori y Wang, 2001). Los niveles de fenoles para la variedad *Algerie* de níspero aumentan a lo largo del desarrollo, alcanzándose los niveles más altos durante la recolección (Casado, Sellés, Gómez, y Bru, 2003b), mientras que para las variedades *Mogi* y *Tanaka* el contenido de fenoles decrece hasta alcanzar el mínimo en el momento del cambio de color del fruto y después aumenta progresivamente alcanzando el máximo en la recolección (Ding, Chachin, Ueda y Mochioka, 1998a; Ding, Chachin, Ueda, Imahori y Wang, 2001). Sin embargo, las fluctuaciones en los niveles de fenoles en el níspero suelen ser pequeñas durante la maduración independientemente de la variedad (Ding, Chachin, Ueda y Mochioka, 1998a; Ding, Chachin, Ueda, Imahori y Wang, 2001) y para otras especies de la misma familia (Hobson, 2007; Amiot, Tacchini, Aubert y Oleszek, 1995).

En la degradación oxidativa de estos compuestos fenólicos, participan dos enzimas que son muy relevantes en términos de calidad de frutos y vegetales, por la formación de melaninas que oscurecen los frutos. Estas enzimas son la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD). A pesar de que las PODs están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, su papel en el pardeamiento enzimático de frutos y vegetales está todavía bajo discusión, debido a que

el nivel de  $\text{H}_2\text{O}_2$  interno en las plantas limita la actividad peroxidasa. Se ha propuesto que la PPO puede actuar como promotor de la POD puesto que en las reacciones de oxidación de compuestos fenólicos se genera  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Richard-Forget, y Gaillard, 1997; Subramanian, Venkatesh, Ganguli, S. and Sinkar, 1999). El estado antioxidante de diferentes frutos y vegetales puede decrecer por la oxidación directa de estos en presencia de PPO y POD (Jiménez, Escribano y García, 1998; Jiménez, y García. 1999). Sin embargo, la principal enzima responsable del pardeamiento enzimático es la PPO, aunque no debe ser excluido un posible efecto sinérgico entre PPO y POD (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

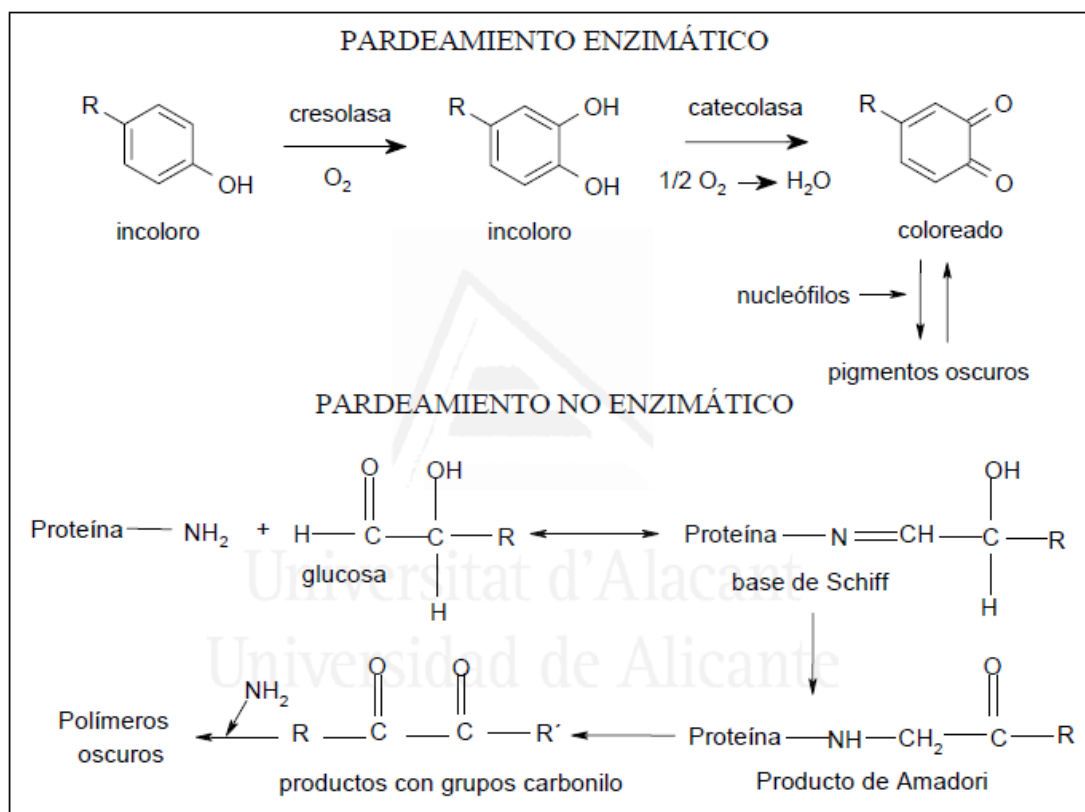


Figura 7 Reacción de pardeamiento enzimático y no enzimático (reacción de Maillard), recuperado de Sellés (2007)

Uno de los objetivos principales de la industria alimentaria es prevenir el pardeamiento enzimático antes o durante el procesamiento de frutos y vegetales. El control de este fenómeno requiere un conocimiento químico del tipo de sustratos fenólicos presentes en cada planta, del nivel de compuestos reductores, el nivel de accesibilidad del O<sub>2</sub>, la naturaleza de los diferentes compuestos oxidables y la polimerización y degradación de las o-quinonas. Además, es necesario conocer el nivel de PPO y los sustratos disponibles a lo largo de los diferentes estados de desarrollo de la planta y sobre todo, es importante distinguir entre el pardeamiento enzimático y no enzimático (figura 7) (reacción de Maillard) (Lee y Witaker, 1995).

Este pardeamiento no enzimático consiste en la condensación de un grupo aldehído o cetona de un azúcar con un grupo amino libre para formar una base de schiff, la cual se reorganiza para formar una cetamina estable (producto de Amadori) y finalmente se degradan a productos reactivos que contienen grupos carbonilo. Estos grupos pueden reaccionar con grupos amino dando lugar a polímeros oscuros. Esta reacción que tiene lugar al calentar mezclas de aminoácidos y carbohidratos (Walker y Mckersie, 1993) se ha descrito en uva (Cheynier, y Ricardo da Silva, 1991) y manzana (Oleszek, Chang, Jaworski y Price, 1989; Richard, Goupy y Nicolás, 1992a).

Entre las diferentes técnicas para controlar el pardeamiento y mantener la calidad de frutos y vegetales, una de las más usadas es la aplicación de inhibidores químicos, los cuales consiguen inactivar los mecanismos no deseados. En principio, la actividad de esta clase de

inhibidores implica una interacción directa con la enzima o reaccionan preferiblemente con el producto que conduce por reacción no enzimática a la formación de pigmentos oscuros.

Entre los diversos tipos de inhibidores vamos a destacar cuatro grupos: sulfitos, agentes antioxidantes o reductores, acidulantes y compuestos quelantes. Los sulfitos son los compuestos más efectivos en prevenir el pardeamiento enzimático (Sapers, 1993). Aunque el mecanismo de actuación de los sulfitos para prevenir el pardeamiento no está claro, pueden provocar una inhibición directa de la enzima, como se ha observado en la inhibición de PPO de fresa por metabisulfito de sodio (Wesche y Montgomery, 1983), pueden interaccionar con los intermedios evitando que estos participen en la formación de pigmentos (Sayavedra y Montgomery, 1986) o pueden actuar como agentes reductores convirtiendo a las quinonas en difenoles. A pesar de su efectividad en la prevención de la calidad de frutos y vegetales, estos compuestos están sujetos a restricciones debido a que provocan efectos adversos en la salud. Entre los antioxidantes, se han utilizado compuestos fenólicos sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA), ampliamente utilizados en alimentación para proteger el sabor y color de los alimentos y algunos compuestos fenólicos naturales como tocoferol, derivados del ácido cinámico y flavonoides como la quercetina y el kaemferol (Ashie, Simpson and Smith, 1996).

Una de las mejores alternativas al uso de los sulfitos es el ácido ascórbico, este compuesto es altamente efectivo en la inhibición del pardeamiento por su habilidad de reducir las quinonas producidas por la PPO a los fenoles antes de que la reacción de formación de pigmentos tenga lugar. Sin embargo, el ácido ascórbico es muy reactivo y se oxida rápidamente a ácido dehidroascórbico (DHAA), pudiendo reaccionar con otros compuestos que conllevan a

cambios en la calidad de los frutos. A veces se utiliza en combinación con acidulantes, siendo el más utilizado el ácido cítrico debido a su presencia natural en tejidos. Otros inhibidores utilizados son los compuestos sulfhidrilos como mercaptoetanol, ditiotreitól y tiourea por su habilidad como agentes reductores, sin embargo, las concentraciones necesarias para prevenir el deterioro del fruto no son permitidas en alimentación. La cisteína se ha mostrado como un inhibidor fuerte de PPO en banana y manzana, siendo incluso más efectivo que el metabisulfito (Ashie, Simpson and Smith, 1996; Richard, Rouet, Goupy, Philippon y Nicolas, 1992b), sin embargo, la concentración necesaria para alcanzar altos niveles de inhibición tiene efectos negativos en el sabor de los frutos. Además, se han utilizado agentes quelantes como ácidos policarboxílicos, polifosfatos y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) para inactivar a la PPO. A pesar de que muchos de estos compuestos son bastante efectivos en el control del pardeamiento enzimático, a menudo su uso en alimentación está limitado por producir efectos adversos en la salud, debido a un coste efectivo o porque su acción es sólo temporal como el ácido ascórbico. Por este motivo, cada vez se recurre más a la utilización de productos alternativos al metabisulfito como las ciclodextrinas, que tienen la capacidad de incluir una amplia variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo a los polifenoles (Cai, *et. al.*, 1990), dentro de su cavidad hidrofóbica, aunque el coste es elevado. Recientemente, se han utilizado productos de la reacción de Maillard, sintetizados a partir de azúcares (pentosa, hexosa, o disacárido) y compuestos tiol como inhibidores del pardeamiento enzimático en manzana, champiñón y berenjena (Billaud, *et. al.*, 2005).



## **1.4 Métodos de inactivación enzimática**

Para que se produzca este pardeamiento es necesario, por lo tanto, la presencia de los tres componentes: enzima, sustrato más el oxígeno. Como nada se puede hacer o muy poco con el sustrato oxidable, los métodos hoy en uso tienden a inhibir la enzima o a eliminar el oxígeno y algunas veces se combinan ambos métodos

### **1.4.4 Inactivación de la enzima mediante calor**

Tiene la ventaja de que no se aplica aditivo alguno, pero presenta el inconveniente de que la aplicación de calor en frutas frescas produce cambios en la textura, dando sabor y aspecto a cocido.

Para evitar estos inconvenientes se regula el tiempo de calentamiento, acortándolo justo al mínimo capaz de inactivar la enzima por un escaldado inmediato. Se puede controlar la inhibición enzimática por la prueba del catecol. La inhibición es lenta a 75°C, pero se hace rápida a 85°C.

#### **1.4.4.1 Escaldado**

El escaldado es un proceso térmico corto aplicado a frutas y hortalizas, antes de ser congeladas, deshidratadas o enlatadas; los alimentos pueden ser escaldados exponiéndoles agua, vapor, aire caliente o por microondas aproximadamente de 1 a 3 minutos, dependiendo de la naturaleza o tamaño del producto. Actualmente se utilizan procesos térmicos de alta temperatura y corto tiempo (HTST) ya que son los más favorables para la preservación de

color y ciertos nutrientes como las vitaminas. Las ventajas de someter aun escaldado las frutas o verduras son las siguientes (Shafiur, 2003, mencionado por Pinto Arborela, 2010):

- Inhibe reacciones enzimáticas (especialmente las oxidativas: polifenoloxidasas, peroxidasa y catalasa, Yañez Lopez, 2012) y con ello mejora la calidad y valor nutricional del producto, evitando alteraciones no deseadas en el color y sabor.
- Expulsa los gases procedentes de la respiración del producto.
- Reduce la carga microbiana inicial del producto.
- Ablanda el producto.
- Facilita las operaciones preliminares (cortado).
- Mantiene el color natural del producto bajo condiciones óptimas.
- Elimina del alimento aromas a crudo.
- Como una medida de limpieza adicional.

De la misma forma en que mejora la calidad de ciertos productos, también varía notablemente en aspectos no favorables (Shafiur, 2003, mencionado por Pinto Arborela, 2010):

- Cambios en la textura, color y sabor del alimento, por el proceso de calentamiento.
- Pérdidas de sólidos solubles cuando se da un escaldado en agua.
- Varía el estado físico y químico de nutrientes y vitaminas.
- Tiene efectos medio ambientales adversos, por la gran utilización de agua y energía, y el problema de la eliminación de aguas residuales.

**Escaldado por Inmersión en agua**, este método consiste en pasar el alimento por agua caliente, a temperaturas de 75 – 100°C a tiempos controlados y con ello la transferencia de

calor sobre el alimento es mejor, pero las pérdidas son mayores a causa de la lixiviación y el volumen de agua necesaria para este método es mayor que en los de vapor de agua. (Pinto, 2010).

**Escaldado por vapor de agua**, para este tipo de escaldado se utiliza vapor saturado a presión atmosférica o mayor; a este tipo de escaldado se lo caracteriza por el mecanismo de transferencia de calor con baja lixiviación de elementos solubles, bajo potencial de contaminación y pequeño volumen de agua necesario para su utilización. Este tipo de escaldadores son más costosos. (Chimborazo Quizhpi, 2011).

El tiempo de escaldado deberá ser el suficiente para alcanzar una temperatura en el interior de 75°C con un tiempo de 5 y 10 minutos, para el agua en ebullición y aproximadamente 5 min con el uso de vapor; a estas condiciones favorece la inactivación de enzimas, reduce el número de microorganismos, remueve aromas y sabores indeseables, fija el color y ablanda el producto para facilitar el posterior proceso de conservación (Zambrano, 2008 mencionado por Chimborazo Quizhpi, 2011).

#### **1.4.5 Inactivación de la enzima mediante inhibidores químicos**

##### **1.4.5.1 Anhídrido sulfuroso**

Es uno de los más efectivos y económicos inhibidores químicos hoy usados en la industria alimentaria, aunque su olor y sabor desagradables pueden comunicarse al alimento cuando se emplea en grandes cantidades. Su uso no es aconsejable en alimentos ricos en tiamina y vitamina C, pues las destruye. En el caso de la tiamina, el es capaz de romper el anillo

tiazólico de la vitamina, separando el anillo de pirimidina, con lo que pierde su carácter vitamínico.

La polifenoloxidasa es muy sensible al, pero la reacción debe realizarse antes que se formen las quinonas por oxidación del sustrato, pues éstas oxidan al, por lo que pierde entonces su propiedad de inhibir la enzima.

#### **1.4.5.2 Ácidos**

Bajo un pH 2,5 cesa la actividad enzimática, que es óptima entre 5 y 7. Aunque luego se vuelva al pH original de la fruta, la enzima no se recupera, impidiéndose así el pardeamiento. Entre los ácidos más usados está el málico, que se agrega al prensar la fruta: caso de la manzana, de la cual es uno de sus componentes naturales (30); también se usa, pero en menor proporción, el ácido cítrico.

#### **1.4.5.3 Ácido ascórbico**

Este ácido es el más recomendado para evitar o minimizar el pardeamiento enzimático, por su carácter vitamínico inofensivo. El ácido ascórbico por sí mismo no es un inhibidor de la enzima: actúa sobre el sustrato, de modo que puede adicionarse después de haberse formado las quinonas; Tiene la propiedad de oxidarse a ácido dehi-hidroascórbico, reduciendo la quinona a fenol (35).

Esto lo hace el ácido ascórbico hasta que se haya transformado totalmente en dehidroascórbico que ya no puede reducir las quinonas, de manera que éstas continúan, entonces, su oxidación hasta la formación de melanoides. El ácido dehidroascórbico aún puede ser perjudicial al formar, en la esterilización posterior, melanoides con los aminoácidos

presentes; por eso la adición de ácido ascórbico no es eficaz en cerezas, ciruelas y frutillas. Sin embargo, si se agrega a otras frutas exceso de ácido ascórbico para inactivar totalmente la enzima, se logra prevenir el pardeamiento en forma efectiva y permanente.

Productos especialmente propensos a empardecer por oxidación química, como manzanas, peras, duraznos, damascos, ciruelas y plátanos entre las frutas, y papas, espárragos, zanahorias entre las hortalizas, deben mantenerse, inmediatamente después de cortadas o peladas, en agua adicionada de 0,1-0,2 % de ácido ascórbico y de 0,2% de ácido cítrico.

Además, para evitar alteraciones de color por oxidación química en las conservas enlatadas, es conveniente agregar por cada litro de líquido de relleno 0,5-1 g de ácido ascórbico (y 0,25-0,50 g de ácido cítrico, según lo admita el producto en cuanto al sabor). Para mantener el color de conservas de champiñones y otros hongos es conveniente una adición de 0,15-0,20 g por litro y para el choucroute se agrega a la salmuera 1-2 g/kg de ácido ascórbico, poco antes del envase.

#### **1.4.5.4 Otros inhibidores químicos**

Entre las sales propuestas para controlar el pardeamiento la más usada es NaCl, cuya acción impide la actividad de la polifenol-oxidasa frente al ácido clorogénico. Una sumersión en solución acuosa diluida de NaCl (0,3%) se usa mucho cuando se quiere evitar por corto tiempo el obscurecimiento de frutas peladas, como rodajas de manzanas, antes de ser sometidas al procesamiento; Su contenido en ácido ascórbico se mantiene, entonces, constante durante varias horas.

Se aplica el bloqueo de los hidróxilos fenólicos por adición de complejantes con el cobre de la enzima, como el ácido cítrico (0,2%) y boratos (0,2% + 0,01% ). También la cisteína y otros dadores de SH se unen a los fenoles, dando complejos incoloros, previa reducción de las quinonas.

El uso de jugos de piña o de limón para evitar el pardeamiento en preparaciones caseras, se basa en el contenido de compuestos sulfhídricos del primero y en ácidos cítrico y ascórbico del segundo.

#### **1.4.6 Eliminación del oxígeno**

La exclusión o limitación de la influencia del aire al trabajar y envasar rápidamente el material y en caso necesario con ayuda del vacío o en atmósfera inerte representan medidas satisfactorias para mantener ciertas frutas al estado lo más natural posible, especialmente en lo que se refiere a textura y sabor. Para frutas destinadas a la congelación, se usa también azúcar y jarabe para cubrir la superficie, retardando así la entrada del oxígeno atmosférico.

Fuera de estos fenómenos de pardeamiento enzimático existen también otras reacciones enzimáticas que pueden conducir a un deterioro en los alimentos. Durante el procesamiento de productos tanto animales (matanza) como- vegetales (frutas, hortalizas, molienda de cereales), la destrucción de los tejidos por acción generalmente mecánica, puede liberar enzimas de sus estructuras tisulares. Las consiguientes transformaciones metabólicas no controladas pueden conducir entonces, a veces, a reacciones enzimáticas que van en desmedro de la calidad del alimento. Es así que la ya mencionada lipoxidasa puede dar origen

a productos de oxidación de sabor rancio o amargo en derivados de cereales y destruir los carotenos. También una excesiva proteolisis enzimática puede conducir a un deterioro del tejido, como sucede en la putrefacción de productos cárneos y marinos.

Por otra parte, el reblandecimiento exagerado o la pérdida de consistencia de frutas y hortalizas que han sobrepasado su estado de madurez tienen su origen en una pectinólisis no controlada por pectinasas. En el fruto fresco e intacto estas enzimas se encuentran separadas de su sustrato, las pectinas; Pero al producirse la ruptura celular en el fruto alterado se genera entonces su reacción de deterioro (Lopez 2003).

## **CAPÍTULO II**

### **II. MARCO METODOLÓGICO**

La presente investigación se desarrolló en la Filial de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en la provincia de Cutervo – Cajamarca así también algunos análisis fueron realizados en la sede de la Universidad. Se emplearon los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química e Industrias Alimentarias (Laboratorios de Control de Calidad, Tecnología de alimentos, fisicoquímica y química orgánica).

#### **2.5 POBLACIÓN Y MUESTRA**

##### **2.5.1 Población**

Conformada por la producción de níspero de la provincia de Cutervo - Cajamarca que se comercializa en el mercado mayorista Santa Celia.

##### **2.5.2 Muestra**

15 kg de níspero

#### **2.6 VARIABLES**

##### **2.6.1 Variable independiente**

- Porcentaje de ácido cítrico y ascórbico en solución



### 2.6.2 Variable dependiente

- Pardeamiento enzimático de la pulpa de níspero

Tabla 2

Diseño experimental de la evaluación de inactivación enzimática de pulpa de níspero

	Tratamientos		
	T1	T2	T3
R1	R1T1	R1T2	R1T3
R2	R2T1	R2T2	R2T3
R3	R3T1	R3T2	R3T3

Nota. Elaboración propia (2019)

Donde:

T1, T2, T3 = métodos de inactivación de enzimas

T1 = Con ácido cítrico

T2 = Con ácido ascórbico

T3 = Con ácido cítrico + ácido ascórbico

R1, R2, R3= repeticiones de métodos de inactivación enzimática

Tabla 3

*Operacionalización de variables*

<b>Variables</b>	<b>Indicador</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Instrumento</b>
<u>Variable independiente</u>			
Concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico	Por agente químico: ácido cítrico y ácido ascórbico	Concentración (g/ml) 2% Ácido cítrico 1,5% de Ácido ascórbico 2% Ácido cítrico y ascórbico	Cronometro, baño maría, balanza
<u>Variable dependiente</u>			
Pardeamiento enzimático	Inactivación de la polifenoloxidasas	Espectro de absorción/Absorbancia	Espectrofotómetro, baño maria

Nota. Elaboración propia (2019)

## 2.7 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### 2.7.1 Equipos e Instrumentos de recolección de datos

#### 2.7.1.1 Equipos e instrumentos

- Agitador termomagnético
- Balanza analítica. Balanza semianalítica, marca Ohaus sensibilidad 0,01g. EE.UU.
- Balanza semianalítica marca OHAUS sensibilidad 0.1g y capacidad de 300 g.
- Baño María Memmert serie li-X-S, rango de temperatura 0° a 95°C

- Bomba de vacío de membrana/compresor AIRJET mini, 100 mbar.
- Centrifugadora electrónica marca BOECO GERMANY, 0-6000 rpm.
- Congeladora FAEDA.
- Cronómetro.
- Espectrofotómetro marca UNICO, EE.UU. Vis-UV.
- Estufa marca MEMMERT 230°C.
- Extractor tipo Soxhlet.
- Licuadora marca OSTER 4655,3 velocidades.
- Mufla THERMOLYNE tipo F48010-33.
- Potenciómetro rango 0 a 14 digital Marca HANNA
- Refractómetro digital 0 – 32 % Marca HANNA.
- Refrigerador LG y Cocina semi-industrial.

#### **2.7.1.2 Materiales**

- Agitador de vidrio.
- Baguetas de vidrio.
- Buretas PYREX 25 y 50 ml.
- Crisoles de porcelana 50,100 ml.
- Embudos buchner y de vidrio de 10 cm de diámetro.
- Fiolas 50, 100, 250 y 500 ml.
- Gradillas de madera y/o metálicas.
- Kitasatos marca PYREX 250 ml.

- Matraces Erlenmeyer marca PYREX 100, 250 y 500 ml
- Morteros y pilones de porcelana.
- Papel filtro Whattman N° 40- 42.
- Pipetas de vidrio 0.1; 0.25; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0; 10 mL.
- Probetas de vidrio 10, 100 y 250 ml.
- Picetas de 1 l.
- Soporte universal con porta bureta.
- Termómetro 0 – 150 °C, marca BOECO Germany.
- Tubos de plástico para centrifuga de 15 ml.
- Cuchillos de acero inoxidable de mango blanco N° 6.
- Ollas de acero inoxidable 5, 10,20 Litros.
- Vasos de precipitación PYREX 50, 100, 250, 600 y 1000 ml.

#### **2.7.1.3 Reactivos y soluciones**

- Ácido ascórbico grado alimentario.
- Ácido clorhídrico Q.P.
- Ácido sulfúrico Q.P.
- Agua destilada.
- Acetona Q.P.
- Acetato de Sodio Q.P.
- Alcohol etílico al 96% de pureza.
- Buffer fosfato 0,1 M pH 6,5

- Catecol
- Etanol 96% v/v.
- Fosfato de sodio 100mM pH 6.0)
- Glucosa anhidra grado reactivo
- Hexano Q.P.
- Solución alcohólica de Fenoltaleína al 1%
- Solución de Hidróxido de sodio 0,1 y 1 N
- Tiosulfato de sodio 5H<sub>2</sub>O Q.P.
- Otros reactivos usados en los análisis fisicoquímicos

#### **2.7.1.4 Materiales e Instrumentos para la recolección de datos**

- Borradores
- Hojas bond
- Lapiceros
- Lápiz
- Cámara fotográfica
- Cartuchos de tinta
- Computadora personal
- Impresora
- USB

### **2.7.2 Métodos de Análisis**

Los métodos de análisis que se emplearon para el desarrollo del trabajo de investigación se presentan a continuación:

#### **2.7.2.1 Análisis de humedad**

El objetivo de este análisis fue determinar el % de humedad en el níspero, método basado en la pérdida de peso que sufre la muestra por calentamiento hasta obtener peso constante.

#### **Materiales y Equipos**

- Balanza analítica.
- Placas petri.
- Estufa.
- Desecador.
- Pinzas metálicas.

#### **Procedimiento Experimental**

- Colocar las placas petri en la estufa a una temperatura de 105°C por 15 minutos, para eliminar la humedad existente.
- Pasado este tiempo, sacar las placas petri con una pinza metálica e inmediatamente llevarlas a un desecador por un tiempo de 10 minutos aproximadamente y proceder a pesarlas y rotularlas.

- Luego, adicionar 2g a cada placa petri y llevar a la estufa por una hora a 105°C.
- Pasado la hora, colocar las placas petri con la pinza metálica en un desecador por 10 minutos.
- Finalmente pesar y calcular el porcentaje de humedad.

$$\%H = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

Donde:

$m_1$ : Peso de la muestra inicial + placa petri.

$m_2$ : Peso de la muestra después de secado + placa petri.

$m$ : Peso del lactosuero utilizado.

#### **2.7.2.2 Análisis de Acidez Titulable, método 947.05 A.O.A.C. (2010)**

##### **Materiales, Reactivos y Equipos**

- Matraces Erlenmeyer.
- Pipeta de 10 ml.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) a 0,1 N.
- Fenolftaleína.
- Equipo de titulación.

**Procedimiento Experimental:**

- Tomar 10 ml de zumo de níspero vacuno y verter en el matraz Erlenmeyer. Luego, agregar 3 gotas de fenolftaleína, enseguida agitar.
- Se procede a titular con NaOH 0,1 N hasta llegar al punto de viraje (color grosella).
- Anotar el gasto y realizar los cálculos correspondientes.
- Repetir 3 veces la misma experiencia.

$$\% \text{ Ácido cítrico} = \frac{G \times 0,1 \times 0,064}{\text{Vol. de la muestra}} \times 100$$

Donde:

G: Gasto de la titulación.

**2.7.2.3 Análisis de Cenizas, método 945.46 A.O.A.C. (2010)****Materiales y Equipos:**

- Balanza analítica.
- Cocina eléctrica.
- Crisoles.
- Mufla.
- Pinzas metálicas.



**Procedimiento Experimental:**

- Pesar el crisol en la balanza analítica. Luego, colocar 10 g de níspero.
- Enseguida, llevar el crisol a la cocina para que elimine la mayor parte del agua, hasta que deje de emanar humo.
- Inmediatamente, colocar a la mufla con la pinza metálica y dejar por 6 horas a una temperatura de 550°C.
- Pasado este tiempo, trasladar el crisol al desecador por media hora y rápidamente pesar.
- Finalmente, calcular el porcentaje de cenizas con la siguiente fórmula.

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(\text{Peso del Crisol} + \text{Cenizas}) - \text{Peso del Crisol}}{\text{Peso del Crisol} + \text{Muestra}} \times 100$$

**2.7.2.4 Análisis de Proteína****Materiales, Reactivos y Equipos**

- Balanza analítica.
- Balón Kjeldahl.
- Matraz Erlenmeyer.
- Digestor.
- Ácido Bórico al 4%.
- Ácido Clorhídrico 0,1 N.
- Rojo de metilo.

- Equipo de destilación.
- Equipo de titulación.

### **Procedimiento Experimental**

- Pesar 0,1 g de níspero, luego colocar en un balón Kjeldahl.
- Enseguida pesar 1 g de catalizador, luego adicionar al balón Kjeldahl contenido la muestra.
- Adicionar también al balón 3 ml de ácido sulfúrico y agitar.
- Una vez terminado de agitar, llevar el balón al digestor, se deja hasta que se obtenga un color verde esmeralda.
- Posteriormente se enfría la solución. Una vez enfriado la muestra, se lleva a destilar.
- En un matraz Erlenmeyer, adicionar 5 ml de ácido bórico al 4%, luego 3 gotas de Rojo de metilo, donde aquí recibiremos el destilado el cual debe llegar a los 50 ml, cuya coloración será amarilla.
- Finalmente, titular con la solución de ácido clorhídrico 0,1 N, hasta la aparición nuevamente de un color rojo grosella.
- Anotar el gasto y calcular el porcentaje de proteínas.
- .

$$\%N = \frac{V \times N \times Meq}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

$$\%P = \%N \times F$$

Donde:

V: Gasto de la titulación.

N: Normalidad del Ácido Clorhídrico.

Meq: Miliequivalente del nitrógeno (0,014)

%N: Porcentaje de nitrógeno presente en la muestra.

%P: Porcentaje de proteínas.

F: Factor de conversión del nitrógeno a proteína en nuestro caso es 6,38 por ser un producto lácteo.

#### **2.7.2.5 Análisis de Grasa**

##### **Materiales, Reactivos y Equipos:**

- Mortero.
- Papel filtro.
- Pinza.
- Éter etílico.
- Balanza analítica.
- Cocina eléctrica.
- Desecador.
- Equipo de Soxhlet.
- Estufa.

**Procedimiento Experimental:**

- En un papel filtro tarado, pesar 5 g de níspero desecado y triturado.
- Enseguida se elabora el cartucho, en otras palabras, se dobla el papel filtro contenida la muestra con el fin de conferirle mayor seguridad y evitar fugas de la muestra.
- Luego rotular y llevar a la estufa el cartucho para que pierda la humedad de nuestras manos a 105 °C por 15 minutos.
- Pasado el tiempo, se retira la muestra con una pinza y llevar al desecador por 15 minutos.
- Posteriormente, se vuelve a pesar y colocar el cartucho en el equipo Soxhlet, específicamente en el extractor. Conectar un balón previamente pesado en el sistema Soxhlet. También se instala el refrigerante y conectar a corriente eléctrica la cocina.
- Enseguida se añade el éter por la parte superior del refrigerante, lentamente, hasta llegar a la sifonada por el tubo lateral y añadir adicionalmente de 10 20 % del volumen de eter.
- Extraer la grasa de la muestra contabilizando un total de 10 sifonadas por un lapso de 90 minutos.
- Transcurrido el tiempo de extracción, dejar enfriar, retirar el cartucho del cuerpo intermedio, destilar el éter y cuando el balón no contenga más disolvente, desmontarlo.
- Desecar el residuo en una estufa de aire a 105°C durante 30 minutos, enfriar en un desecador y pesar.
- Por la diferencia de peso se obtiene la grasa que hay en la muestra y luego se lleva a porcentaje.

$$\% \text{ Grasa Bruta} = \frac{\text{Peso de la grasa de la muestra deshidratada}}{\text{Peso de muestra deshidratada}} \times 100$$

#### **2.7.2.6 Análisis de fibra**

##### **Materiales, Reactivos y Equipos**

- Matraces Erlenmeyer.
- Papel filtro.
- Papel tornasol.
- Vaso precipitado de 500 ml.
- Agua destilada.
- Ácido sulfúrico 1,25%.
- Hidróxido de Sodio 1,25%.
- Balanza analítica.
- Estufa.
- Mufla.

##### **Procedimiento Experimental**

###### **Primera Digestión**

- De la muestra, la cual se utilizó en la extracción de grasa (Método de Soxhlet), pesar exactamente 1 gramo. Luego colocarlo en un vaso precipitado de 500 ml.

- Adicionar al vaso con la muestra 200 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1,25%, enseguida calentar hasta ebullición y mantener por 30 minutos.
- Pesar el papel filtro y colocarlo en el equipo de filtración.
- Realizar la filtración utilizando el embudo de Bush instalado en el matraz, lavar con agua destilada caliente y neutralizar la acidez.

#### **Segunda Digestión:**

- Añadir 200 ml de NaOH 1,25% y poner a ebullición por un lapso de 30 minutos.
- Enseguida se realiza el filtrado al vacío y se lava con agua destilada caliente.
- Una vez realizado aquello, se lleva a la estufa a una temperatura de 105°C por 2 horas.
- Transcurrido el lapso señalado se procede a retirar de la estufa y a colocar en el desecador por 10 a 15 minutos y pesar, se obtiene el dato del peso 1.
- Luego se lleva a la mufla, en donde las condiciones de temperatura son muy elevadas a 550°C por 4 horas. Con este procedimiento se obtiene el peso 2.

$$\% \text{ Fibra Bruta} = \frac{\text{Peso de residuo} - \text{Peso de Ceniza}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

#### **2.7.2.7 Análisis de Azúcares Reductores**

##### **Materiales, Reactivos y Equipos**

- Bagueta o varilla de agitación.

- Papel filtro.
- Pipeta de 5 ml.
- Probeta.
- Vasos precipitados de 100 ml.
- Agua destilada.
- Acetato de Plomo al 30%.
- Fehling A.
- Fehling B.
- Ferrocianuro de Potasio.
- Sulfato de Sodio Saturado ( $\text{NaSO}_4$ ).
- Equipo de titulación.
- Cocina eléctrica.

**Procedimiento Experimental:**

- En un vaso precipitado colocar 20 ml de lactosuero vacuno, luego 30 ml de agua destilada.
- Enseguida, adicionar 6 ml de Acetato de Plomo al 30% y 4 ml de Sulfato de Sodio Saturado. Luego agitar.
- Posteriormente, se filtra la solución preparada.

- Mientras tanto, preparar e indicador, pesando 2,5 g de Ferrocianuro de Potasio para luego disolverlo en 50 ml de agua destilada en un vaso precipitado, seguidamente agitar con la bagueta hasta que disuelva bien el ferrocianuro de Potasio.
- Una vez terminado de filtrar la solución, vaciar a la bureta para posterior titulación.
- En un vaso precipitado, colocar 5 ml de Fehling A, 5 ml de Fehling B, 40 ml de agua destilada y 5 ml de Ferrocianuro preparado. Luego llevarlo a ebullición.
- Una vez comenzado a ebullición, se inicia la titulación hasta que vire del color azul a un color marrón oscuro.
- Finalmente, anotar su gasto y hallar el porcentaje de lactosa.

$$\% \text{Glucosa} = \frac{6,46 \times \text{Vol. de la dilución}}{\text{Gasto} \times \text{Peso de la muestra} \times 10}$$

Donde:

6,46: Factor de la glucosa, donde son los mg de lactosa presente en 1 ml de solución de Fehling.

Vol. de la disolución es en nuestro caso 50ml.

El peso de la muestra es 20 ml de solución problema.

### 2.7.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la evaluación organoléptica fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% y una prueba de Tukey



para determinar la diferencia existente entre las formulaciones. Se empleó el software estadístico SPSS versión 22.

El modelo estadístico que se siguió fue un modelo de diseño experimental al azar completamente aleatorizado.

$$E_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

$E_{ij}$  = Variable respuesta observada

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto del i-ésimo nivel

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental asociado a la ij-ésima variable experimental

Tabla 4

*Análisis de varianza para los tratamientos*

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>
Tratamientos	2
Error	27
<b>Total</b>	<b>29</b>

Nota. Elaboración Propia (2019)

## **2.8 Metodología experimental**

### **2.8.1 Caracterización de la materia prima**

Consistió en la caracterización fisicoquímica del níspero y se realizó de acuerdo a la sección 2.3.2.

## **2.8.2 Descripción del diagrama de flujo para la obtención de pulpa de níspero y evaluación de tratamientos**

### **2.8.2.1 Recepción de materia prima**

Los nísperos se obtuvieron del Mercado mayorista Santa Celia de la provincia de Cutervo recepcionándolos en el laboratorio.

### **2.8.2.2 Selección y clasificación**

Los frutos de níspero se seleccionaron en forma manual teniendo como base su estado de descomposición, daños físicos y químicos (color y textura).

Se clasificaron según su estado de madurez; los seleccionados fueron los maduros, esto según sus características sensoriales: tonalidad del color del fruto.

### **2.8.2.3 Lavado y desinfección**

La materia prima se lavó con agua potable eliminando tierra y otros. Se desinfectó con hipoclorito de sodio a 50 ppm.

### **2.8.2.4 Acondicionamiento**

Después de orear las frutas. Se procedió a pelar y trozar en gajos de 4 mm aproximadamente los frutos de níspero.

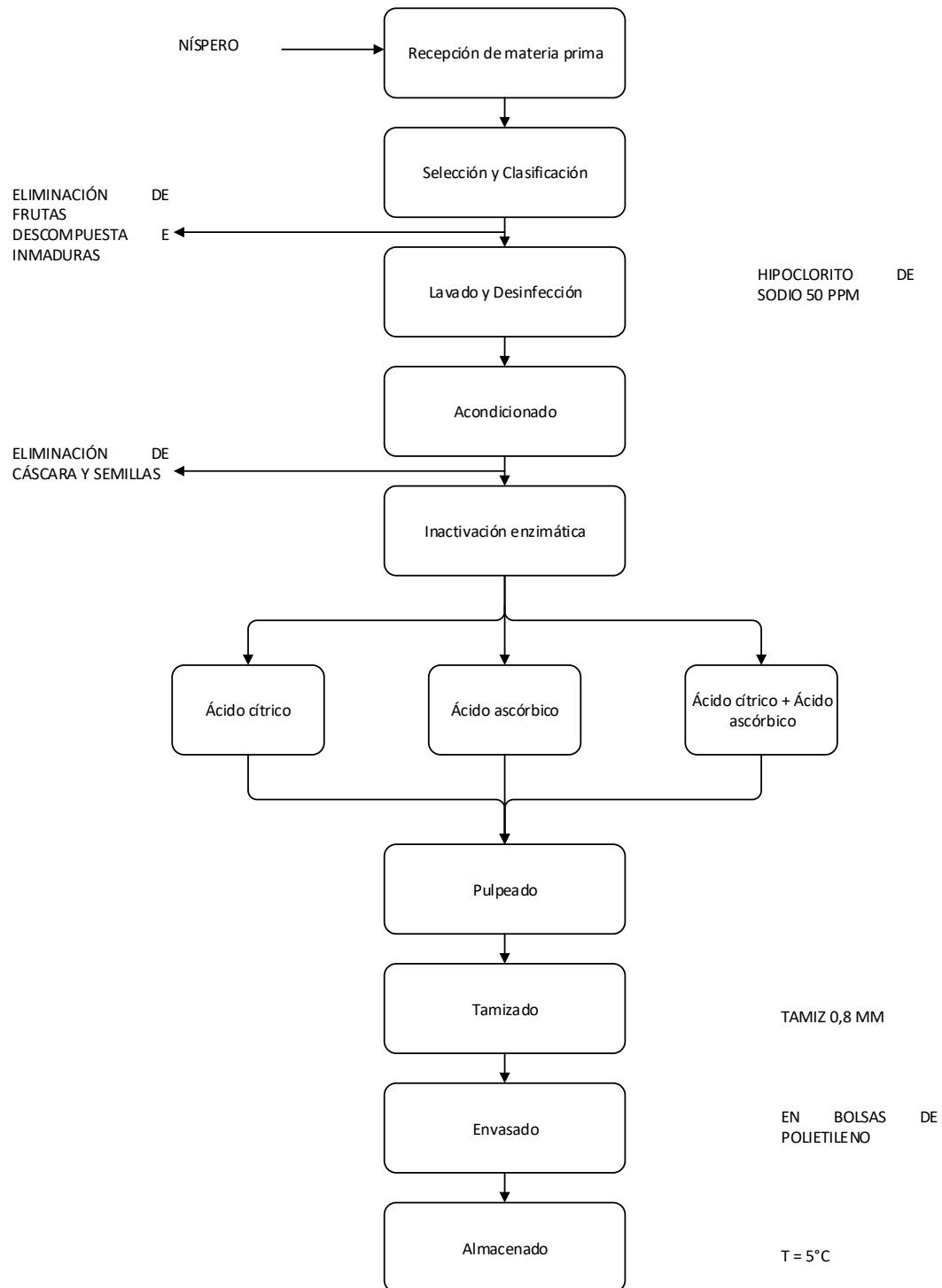


Figura 8 Flujo de proceso para la obtención de pulpa de nispero y evaluación de tratamientos, elaboración propia (2019)

#### **2.8.2.5 Inactivación enzimática**

A los frutos de níspero acondicionados, se procedió a inactivar las enzimas por los siguientes métodos:

Por adición de ácido cítrico al 2%, la fruta acondicionada se sumergió en agua conteniendo ácido cítrico por un tiempo de 4 min.

Por adición de ácido ascórbico 2%, la fruta acondicionada se sumergió en agua conteniendo ácido ascórbico por un tiempo de 4 min.

Por adición de ácido cítrico y ácido ascórbico al 2%, en cantidades iguales, la fruta acondicionada se sumergió en agua conteniendo ácido cítrico y ácido ascórbico, con un tiempo aproximado de 4 min.

#### **2.8.2.6 Pulpeado**

La fruta escaldada se sometió a un pulpeado, reduciendo los trozos de fruta a una pasta.

#### **2.8.2.7 Tamizado**

Luego se procedió a tamizar la pulpa a través de una malla de abertura de 0.8 mm aproximadamente.

#### **2.8.2.8 Envasado**

La pulpa se envaso en bolsas de polietileno de alta densidad.

### **2.8.2.9 Almacenamiento**

Posteriormente la pulpa se almaceno en refrigeración a 5°C y protegidos de la luz; para los análisis respectivos.

## **2.8.3 Actividad de la polifenoloxidasas**

### **2.8.3.1 Determinación de polifenoloxidasas en pulpa de níspero**

Con el fin de conocer su máxima actividad se realizó un experimento previo en el níspero. Se pesaron 100g de la pulpa previamente obtenida y se molieron con 100 ml de NaCl al 5% en una licuadora por 1 minuto, se dejó reposar a 4°C durante 48 h y posteriormente se filtró con ayuda de tela organza y posteriormente con papel filtro. Una vez obtenidos los extractos, se realizó la determinación de polifenoloxidasas. También se determinó la cantidad de proteína en el extracto.

### **2.8.3.2 Cuantificación proteica**

A partir de una solución de albúmina 0.25 mg/ml se tomaron los siguientes volúmenes: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 0.0 ml, se aforaron con agua destilada a un volumen de 3 ml, posteriormente se adicionaron 3 ml de reactivo de Bradford, los tubos fueron agitados y se midió la absorbancia a 595nm. Obtenidas las absorbancias de cada concentración se realizó una curva tipo, en la cual se interpolo la absorbancia obtenida de 1 ml de la muestra problema siguiendo el mismo procedimiento (Bradford, 1976).

### **2.8.3.3 Extracción de la enzima polifenoloxidasas**

Se homogeneizaron 100 g de pulpa con 100 ml de acetona fría y se dejó reposar dos horas, después se filtró por tela y el residuo presente en la misma se dejó toda la noche para evaporar completamente la acetona. Una vez evaporada la acetona, el residuo se mezcló con 100 ml de regulador de fosfatos 0.01M, pH 7,2 por 20 minutos, el homogeneizado fue entonces centrifugado a 5000 rpm y el sobrenadante rescatado se saturó hasta 70% con sulfato de amonio y se dejó reposar 48 horas, transcurrido éste tiempo se centrifugo a 5000 rpm y por decantación se obtuvo el precipitado. Posteriormente se colocó en bolsas de diálisis para eliminar el sulfato de amonio, estas bolsas se mantuvieron en agua destilada por 5 días realizando cambios de la misma, pasados los 5 días se tomaron 5 ml del agua y se agregaron 2 g de cloruro de bario como indicador de la ausencia de sulfato de amonio. Una vez libre de sulfato se mezclaron las bolsas de diálisis y se liofilizaron para concentrar la enzima, por último, se almacenaron en viales, en refrigeración (4°C) hasta su análisis (Ding et al., 2001).

### **2.8.3.4 Separación de las enzimas polifenoloxidasas por Sephadex G-200.**

En cada vial se liofilizaron 10 ml de muestra, lo que se resuspendió en 1 ml de regulador de fosfatos pH 7,2, 0,01 M y fue inyectado en una columna de 50 x 3,2 cm, empacada con Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), el cual tiene un rango de separación entre 5,000 y 200,000 kDa, la columna fue eluída con el mismo regulador para la obtención de 50 fracciones, cada una con 5 ml con una velocidad de salida de 0,6 ml por minuto. Una vez obtenidas las fracciones se leyeron en el espectro a 280nm, y posteriormente se realizó la determinación enzimática correspondiente. De la fracción que mostró mayor actividad de polifenoloxidasas se determinó la actividad específica.

### **2.8.3.5 Determinación de la actividad enzimática de polifenoloxidasa**

La actividad de PFO se determinó por el método de Kimberly y Lee (1981), se basó en la medición de la velocidad de formación del producto de reacción, que se originó de la oxidación del catecol utilizado como sustrato a una concentración de 0,5 M, éste fue disuelto en regulador de fosfatos 0,01 M, pH 7,2 y se utilizaron 0,4 ml de esta solución de catecol, 0,3 ml de la enzima y se aforo a un volumen final de 3 ml con el mismo regulador. Al mismo tiempo se preparó el testigo (0,4mL de catecol, 2,6 ml de regulador), se colocó en el espectrómetro para ajustar a una longitud de onda de 420 nm, en la celda se colocaron los reactivos y al final se agregó la enzima, se homogeneizó el contenido agitando la celda y se colocó inmediatamente en el espectrofotómetro, se tomó la primera lectura de absorbancia y el resto cada 30 segundos hasta llegar a 3 minutos, la reacción se llevó a cabo a 25° C. Una vez que se obtuvieron los datos correspondientes, se determinaron las unidades de actividad específica de la enzima con ayuda del coeficiente de extinción molar de la polifenoloxidasa a 280 nm (2,49 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) obtenido del Manual Worthington (1993).

## **CAPÍTULO III**

### **III RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Después de haber realizado la metodología descrita y basados en los datos de información recopilados se llegó a obtener los siguientes resultados:

#### **3.1 Caracterización físico química del níspero**

A continuación, en la tabla 5 se presentan los resultados de la caracterización del níspero donde se puede observar un alto contenido de agua (74,2%) el mismo que hace de este fruto altamente vulnerable a la descomposición y reacciones que disminuyan su valor comercial entre ellas el pardeamiento.

Con respecto al porcentaje de proteínas el valor encontrado (1,59%), se encuentra por encima (0,43%) de lo reportado por Pamplona (2003) y muy por debajo del 5% hallado por Look (2003).

El contenido de la grasa mostrado en la tabla es de 0,90%, valor que supera al 0,2% reportado por Pamplona (2003). La diferencia puede deberse al método usado para su cuantificación.

Los carbohidratos hallados en la muestra fresca fue de 18,87%, lo cual constituye uno de los componentes que se encuentra en mayor porcentaje, dicho valor se encuentra por encima del 15,8% reportado por Look (2003) y por debajo del 22,6% de Pamplona (2003).



Tabla 5

*Composición bromatológica del níspero en base a 100 g de porción comestible*

Descripción	Valor
Humedad, %	77,75
Proteína, %	1,59
Grasa, %	0,9
Carbohidratos, %	18,87
Ceniza, %	0,89
Fibra cruda, %	1,75
Acidez titulable, en % ácido málico	0,16
Azúcares reductores totales, %	12,24
Sólidos solubles, °Brix	11,5
Energía total, kcal	89,94

Nota Elaboración propia (2019)

En el resto de componentes se manifiesta la misma tendencia, es decir valores que se aproximan a los reportados por otras investigaciones para el níspero (*Eriobotrya japonica*).

Con respecto a la diferencia entre los resultados Nielsen (2010), manifiesta el método de análisis, la técnica, los instrumentos y equipos, la variedad, zona de producción y el operador son variables que influyen en los resultados de un fruto.

Chen, Liu y Chen (2008), los grados Brix (°Bx) son una forma indirecta de saber el estado de madurez de un fruto, así como también el porcentaje de acidez de un fruto con madurez comercial seguramente contendrá un bajo porcentaje de acidez y un alto contenido de °Bx. Los ácidos orgánicos son un factor importante que tiene influencia en el sabor del fruto. Usualmente estos ácidos se acumulan en las etapas tempranas del desarrollo y son usados

como sustratos respiratorios durante la maduración del fruto. Con respecto a estos parámetros, brix y acidez los valores reportados se asemejan con lo reportado por Zhou, Xu, Sun, Li y Chen (2007), donde las variedades evaluadas se encontraron entre 0.16 a 1.23% de acidez y de 11.15 a 21.38°Bx. El bajo porcentaje de ácido málico podría deberse a su degradación por la enzima málica-NADP a lo largo de la maduración del fruto (Chen, Liu y Chen, 2008).

### **3.2 Actividad de la polifenoloxidasas en pulpa de níspero**

La actividad enzimática de la polifenoloxidasas en la pulpa de níspero fue de 3.17 unidades, superior a los 2.53 unidades reportado por López (2010), quien manifiesta que a mayor estado de madurez del fruto la actividad enzimática de la polifenoloxidasas se incrementa. La cantidad de proteína hallada fue de 0.032 mg.

### **3.3 Evaluación de los métodos de inactivación de la polifenoloxidasas**

En la tabla 6 se puede observar los resultados de la inactivación de enzima polifenoloxidasas por análisis espectrofotométrico.

Tabla 6

*Evaluación de polifenoloxidasa en pulpa de níspero con tratamientos de inactivación enzimática por análisis espectrofotométrico*

Parámetros	Tratamientos		
	T1 (Ácido cítrico)	T2 (Ácido ascórbico)	T3 (Ácido cítrico + Ácido ascórbico)
<b>Actividad enzimática (UA/mg)</b>	36	32	22
<b>Desviación estándar</b>	$\pm 1,886$	$\pm 2,981$	$\pm 2,309$

Nota Elaboración propia (2019)

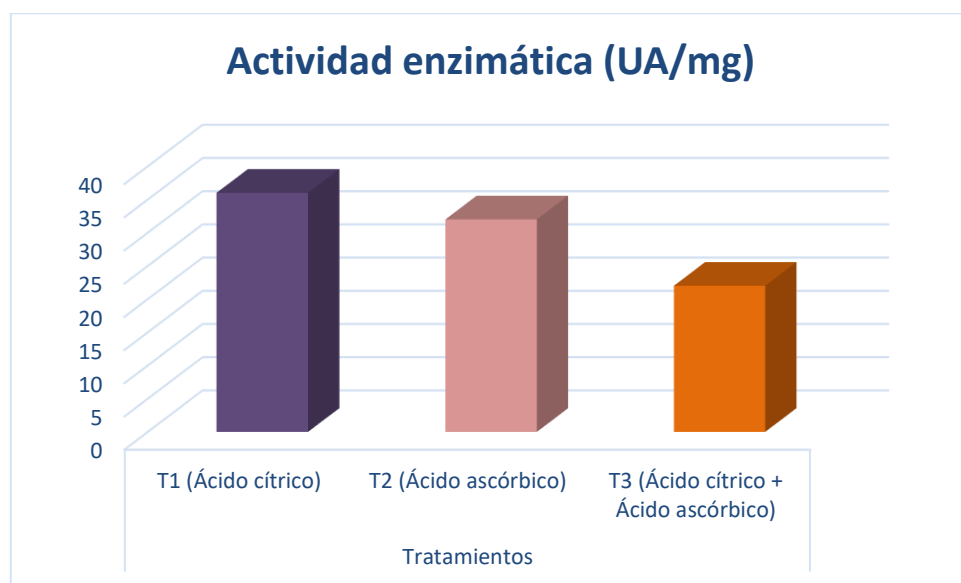


Figura 9 Actividad enzimática en la pulpa de níspero después de la evaluación de los tratamientos, elaboración propia (2019)

Hernández (2009), menciona que existe un poder sinérgico cuando se utiliza mezclas de varios agentes al mismo tiempo puede promover un mecanismo de acción sinérgica, mostrando un fuerte efecto sinérgico en concentraciones del 0.02% con 1% de ácido eritórico, ácido ascórbico o ácido cítrico. Estos mecanismos de acción implican la penetración en el tejido y alteración del centro activo de la polifenoloxidasas, disminución del pH y la aparición de procesos competitivos entre inhibidores-enzima-sustratos. De igual forma (Sepulveda, 2010) indica que los acidulantes se utilizan frecuentemente en combinación con otros agentes de antipardecimiento, debido a que es muy difícil lograr una inhibición completa del oscurecimiento únicamente por el control del pH. El más utilizado es el ácido cítrico que reduce el pardecimiento capturando o quelando el cobre del sitio activo de la PPO, y potencia el efecto de compuestos tales como el ácido ascórbico. Esta información corrobora los resultados obtenidos donde el tratamiento 3 (ácido cítrico + ácido ascórbico), fue el que presentó menor actividad (22 UA/mg).

### **3.4 Evaluación estadística de los resultados de cada tratamiento en la actividad enzimática de la polifenoloxidasas**

Los resultados de la evaluación estadística se presentan a continuación:

#### **1. Planteamiento de hipótesis**

$H_0$ : Las medias de las muestras son Iguales

$H_1$ : Las medias de las muestras no son Iguales

Nivel significancia de  $\alpha = 0.05$

Primero comprobaremos la homogeneidad de varianza

Donde

Ho: No existe diferencia entre las varianzas

H1: Existe diferencia entre las varianzas

Tabla 7

*Homogeneidad de varianza*

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Actividad Enzimática PPO

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,615	2	27	,217

Nota. Elaboración propia (2019)

La tabla 7 que contiene el estadístico de Levene nos permite contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas poblacionales. Donde observamos que el nivel crítico (sig.) es mayor que 0,05, por lo tanto, debemos aceptar la hipótesis de igualdad de varianzas.

Tabla 8

*Pruebas de efectos inter-sujetos para variable temperatura*

**ANOVA**

Actividad Enzimática PPO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1040,000	2	520,000	87,750	,000
Dentro de grupos	160,000	27	5,926		
Total	1200,000	29			

Nota. Elaboración propia (2019)

## 2. Regla de decisión

Si el valor p (Sig) es menor que  $\alpha$ , entonces se rechaza  $H_0$ .

**Conclusión:** Como el nivel de significancia es menor que el 5%, entonces se rechaza  $H_0$  por lo tanto se concluye que el factor (tratamiento) influye en la variable dependiente (actividad enzimática), es decir, los distintos niveles del factor producen distintos efectos en la actividad enzimática de la pulpa de níspero. Quiere esto decir que habrá que estudiar entre qué niveles se den esas diferencias significativas.

Tabla 9

### *Prueba de comparaciones múltiples para los tratamientos*

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Actividad Enzimática PPO						
HSD Tukey						
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar r	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ácido cítrico	Ácido ascórbico	4,000*	1,089	,003	1,30	6,70
	Ácido cítrico +	14,000*	1,089	,000	11,30	16,70
	Ácido ascórbico					
Ácido ascórbico	Ácido cítrico	-4,000*	1,089	,003	-6,70	-1,30
	Ácido cítrico +	10,000*	1,089	,000	7,30	12,70
	Ácido ascórbico					
Ácido cítrico +	Ácido cítrico	-14,000*	1,089	,000	-16,70	-11,30
Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	-10,000*	1,089	,000	-12,70	-7,30

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Nota. Elaboración propia (2019)

En este caso hay que interpretar la columna de significación, si esta es menor o igual que 0,05; por lo que se observa en la tabla 9 que las diferencias entre todos los tratamientos son significativas.

Tabla 10

*Prueba de comparación de medias de tukey para subconjuntos homogéneos*

Actividad Enzimática PPO				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Ácido cítrico + Ácido ascórbico	10	22,00		
Ácido ascórbico	10		32,00	
Ácido cítrico	10			36,00
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Nota. Elaboración propia (2019)

Como resultado de la comparación de medias podemos observar que existen diferencias entre los tres tratamientos , siendo el tratamiento con ácido cítrico y ácido ascórbico la más significativa.

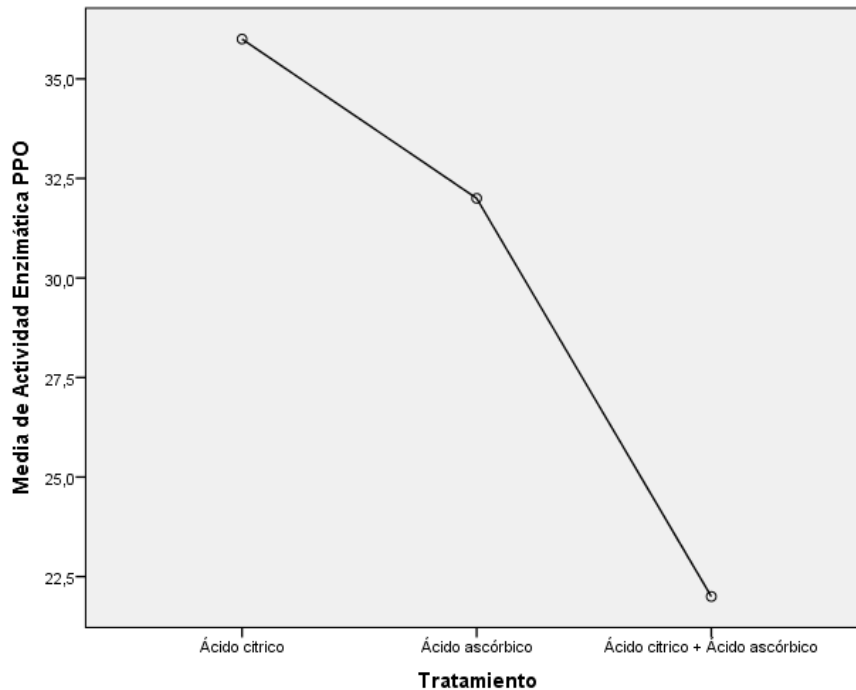


Figura 10 Comparación de medias, Elaboración propia (2019)

El efecto de pH en las enzimas es debido a los cambios en el estado de ionización de los componentes del sistema. Cualquiera de los componentes, ya sea la enzima libre, complejo enzima-sustrato o sustrato pueden someterse a tales cambios. Las enzimas como cualquier proteína contienen grupos ionizables con diferentes estados de ionización el cual depende del pH.

Según López (2010), la actividad catalítica de las enzimas es usualmente confinada a un rango relativamente pequeño de pH, probablemente porque solo una forma iónica de la enzima (o del centro activo) es catalíticamente activa. En su investigación el autor menciona que la polifenoloxidasas de níspero tuvo una actividad máxima a un pH de 8.0 pero un rápido descenso a 8.5. Con respecto a otras investigaciones se pudo observar que la enzima es capaz



de mantener su forma catalítica a pH's bajos ya que de 5-8 presentaron actividad aunque baja. El pH óptimo de actividad de una enzima generalmente es el reflejo del ambiente celular en el que normalmente se encuentra (Lehninger, 1984), y debido a que una de las características del níspero es ser agridulce esto podría explicar la tolerancia de la polifenoloxidasas a cierto pH ácido.

## CAPÍTULO IV

### IV CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a los objetivos planteados en la presente tesis, se concluye lo siguiente:

1. Se logró determinar que el sinergismo del ácido cítrico con el ácido ascórbico permite disminuir la actividad de la polifenoloxidasas retardando el pardeamiento enzimático de la pulpa de níspero.
2. La pulpa de níspero presentó las siguientes características fisicoquímicas: 77,75% de humedad, 1,59% de proteína, 0,9% de grasa, 18,87% de carbohidratos, 0,89% de ceniza, 1,75% de fibra cruda, 0,16% de acidez titulable, 12,24% de azúcares reductores totales, 11,5% de sólidos solubles y 84,94 kcal por 100 g de porción comestible.
3. La polifenoloxidasas en la pulpa de níspero presentó una actividad de 3,17 unidades y con un contenido de proteínas de 0,032 mg.
4. El tratamiento más adecuado para disminuir la acción de la enzima polifenoloxidasas en la pulpa de níspero fue la adición al 2% de una mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico en proporciones iguales.
5. La actividad enzimática en la pulpa de níspero después del tratamiento con ácido cítrico y ácido ascórbico fue de 22 UA/mg.

## **CAPÍTULO V**

### **V RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda emplear otros compuestos químicos como los sulfitos, ácido láctico, sal, entre otros con la finalidad de preservar las características de la pulpa de níspero por mayor tiempo.
2. Promover la investigación en otras enzimas como la catalasa y peroxidasa que son degenerativas de la calidad de muchos frutos de alto valor comercial como: la palta, durazno, cocona entre otros.

## CAPÍTULO VI

### VI BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M., Juan, M., Almela, V., Andreu, I. and Speroni, C. (1997). Estímulo del desarrollo de los frutos de hueso. Serie Divulgació Técnica N° 38. Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, pesca y alimentación.
- Amiot, M., Tacchini, M., Aubert, S. and Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* 57:958-962.
- Amiot, M., Tacchini, M., Aubert, S. and Oleszek, W. (1995). Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning in pear fruits. *J. Agric. Food Chem.* 43:1132-1137.
- Ashie, I.N.A., Simpson, B.K. and Smith, J.P. (1996). Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 36:1-30.
- Barth, M.M., Weston, L. A., and Zhuang H. (1995). Influence of clomazone herbicide on postharvest quality of processing squash and pumpkin. *Journal Food Chemistry.* 43:2389-2393.

- Billaud, C., Maraschin, C., Y. Chow, N., Chériot, S., Peyrat-Maillard, M.N. and Nicolas, J. (2005). Maillard reaction products as natural antibrowning agents in fruit and vegetable technology. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:656-662.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annual Biochemistry.* 72:248-254.
- Caballero, P. (1993). El níspero y su expansión, posibilidades y limitaciones. *Fruticultura profesional* 54:35-40.
- Cai, Y., Caffney, H.G., Lilley, T.H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C.M. and Haslam, E. (1990). Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* 2:2197-2209.
- Casado-Vela, J., Sellés, S., Gómez-Lucas, I. and Bru, R. (2003a). A correlation study of loquat (*Eriobotrya japonica* cv. Algeria) fruit quality parameters: Flesh firmness and purple spotting. *Options Mediterranees, Serie A: Seminaires Mediterranees* 58:187-190.
- Casado-Vela, J., Sellés, S., Gómez-Lucas, I. and Bru, R. (2003b). Evolution of phenolics and polyphenol oxidase isoenzymes in relation to physical-chemical parameters during loquat (*Eriobotrya japonica* cv. Algeria) fruit development and ripening. *Options Mediterranees, Serie A: Seminaires Mediterranees.* 58:161-164.
- Castro, S. y Pinto, L. (2008). Obtención y Conservación de Liofilizado de Níspero, *Eriobotrya japónica*. Tesis de grado. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador.

Disponible en <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/489/1/03%20AGI%20232%20%20TESIS.pdf>. Visitada el 18 de junio de 2019.

- Cerón, L. E. (2005). Evaluación de algunas respuestas bioquímicas en la interacción plantas de ñame (*Dioscorea* spp) resistentes y susceptibles al ataque de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae*. Máster en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Carrera de Química. Bogotá.
- Cheynier, V. and Ricardo da Silva, J.M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39:1047-1049.
- Chen, L., Berenbaum, M., Zangerl, A. and Engeseth, N. (2000). Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *J. Agric. Food Chem.* 48:4997-5000.
- Chen, F.-X., Liu, X.-H., and Chen, L.-S. (2008). Developmental change in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chemistry.* 10:3-16.
- Chunhua, S.; Ya, D.; Bingle, X.; Xiaolong, X.; Yongshu, X.; Qingliang, L. (2001). The purification and spectral properties of polyphenol oxidase from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:381a-381h.
- Couture, R., Cantwell, M. I., Ke, D. and Saltveit, M. E. (1993). Physiological attributes and storage life of minimally processed lettuce. *Horticulture Science.* 28:723-725.

- Crisoto, C., Andris, H. and Mitcham, B. (1993). Tips to reduce bruising during Apple harvesting. Central Valley Postharvest Newsletter 2:6-10.
- Crisoto, C., Garner, D., Ritenour, M., Schap, J. and Rushing, J. (1996). Developing critical bruising threshold for stone fruit. Central Valley Postharvest Newsletter 5:11-13.
- Crouzet, J., Sakho, M and Chassagne, D. (1997). Fruit aroma precursors with special reference to phenolics. Phytochemistry of fruit and vegetables. Ed. Por Tomás-Barberán F.A and Robinson, R.J. Clarendon Press, Oxford. pp 109-123.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. and Clifford, M. N. (2009). Current developments in natural products chemistry. Natural Product Reports. 26:965-1096.
- Day, K. (1992). Management of stone fruit harvest and field operations. Central Valley Postharvest Newsletter 1:4-7.
- Delucchi, G. (2010). La naturalización del «níspero».. En: issn 0524-0476, BONPLANDIA, vol. 19, no. 524-476, pp. 71-77.
- Ding, C-K.; Chachin, K.; Ueda, Y.; Imahori, Y.; y Wang, C. Y. (2001). Metabolims phenolics Compounds during loquat fruit development. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49:2883-2888.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. and Mochioka, R. (1998a). Changes in polyphenol concentrations and polyphenol oxidase activity of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits in relation to browning. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci 67:360-366.

- Fonfría, A. (2010). Fruticultura. En: M. LIBROS (ed.), fruticultura [en línea]. S.l.: s.n., pp. 401. ISBN 8484763986, 9788484763987. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=aawSAQAAQBAJ&dq=El+cultivo+del+nís+pero+ja+ponés.&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.mx/books?id=aawSAQAAQBAJ&dq=El+cultivo+del+nís+pero+ja+ponés.&hl=es&source=gbs_navlinks_s). Visitada el 18 de junio de 2019.
- García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Artés, F. and Tomás-Lorente, F. (1993). Determination of citrus jams genuineness by flavonoids analysis. *Z Lebensm Untersuch Forsch.* 197:255-259.
- Gariglio, N., Juan, M., Almela, V. and Agustí, M. (2002). Histological and physiological study of purple spot of loquat fruit. *Sci. Hortic.* 92:255-263.
- Gariglio, N., Castillo, A., Alós, E., Juan, M., Almela, V., and Agustí, M. (2003a). The influences of environmental factorson the development of purple spot of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Sci. Hortic.* 98:17-23.
- Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V., and Agustí, M. (2003b). Effects of fruit thinning on fruit growth, sugars and purple spot in loquat fruit (*Eryobotria japónica* Lindl.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78:32-34.
- Gariglio, N., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C. and Agustí, M. (2005). Control of purple spot of loquat fruit (*Eriobotrya japonica*) by means of mineral compounds. *Ann. Appl. Biol.* 146:415-420.
- Gil, M. I., García-Viguera, C., Artés F., and Tomás-Barberán, F. A. (1995). Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 68:77-81.



- Hall, N. T., Smoot, J. M., Knight, R. J., and Nagy, S. (2008). Protein and amino acid composition of ten tropical fruits by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28:1217-1221.
- Haruta, M., Murata, M., Hiraide, A., Kadokura, H., Yamasaki, M., Sakuta, M., Shimizu, S., and Homma, S. (1998). Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and in apple. *Biotechnology and Biochemistry*. 62:358-362.
- Hermann, K. (2006). Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.* 11:433-448.
- Hernández, C. (2009). Acción y efectos de la polifenoloxidasas en alimentos. (Tesis para optar el grado inédita). Universidad Veracruzana.
- Hobson, G.E. (2007). Phenolase activity in tomato fruit in relation to growth and to various ripening disorders. *J. Sci. Food Agric.* 18:523-526.
- Horowitz, R. M., and Gentili, B. (1999). Taste and structure of phenolic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 17:696-700.
- Jiménez, M., Escribano-Cebrián, J. and García-Carmona, F. (1998). Oxidation of the flavonol fisetin by polyphenol oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1425:534-542.
- Jiménez, M. and García-Carmona, F. (1999). Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 79:1993-2000.

- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A. and Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:4638-4644.
- Ke, D. and Salveit, E. (2008). Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiol*. 88:1136-1140.
- Kimberly, W., W. and Lee, C. Y. (1981). Characterization of polifphenoloxidase. *Journal of Food Science*. 46:506-514.
- Lee, C.Y. and Whitaker, J. (1995). Enzymatic browning and its prevention, ACS Symposium Series 600, Washington, D.C; American Chemical society Ed.
- Lehninger, A. (1984). Bioquímica 2da Edi. Barcelona, España: Omega, S. A. 345 p.
- Lin, S., (2007). La producción Mundial. Níspero e Investigación con Especial Referencia A China. S.l.: s.n. Disponible en <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.750.2>. Visitada el 20 de junio de 2019.
- Lin, S., Sharpe, R.H. and Janick, J. (1999). Loquat botany and horticulture. *Horticultural Reviews* 23:233-276.
- Liu, L., Cao, S., Xie, B., Sun, Z., Li, X. and Miao, W. (2007). Caracterization of polyphenoloxidase from Litchi pericarp using (-)-epicatequina as substrate. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 55:7140-7143.
- López, P. (2017). Deshidratación de níspero (*Eriobotrya japonica*) para producto de infusión. Tesis de grado. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas. México.

Disponible en <https://repositorio.unicach.mx/bitstream/20.500.12114/1206/1/GAS%20641.44%20L66%202017.pdf>. Visitada el 20 de junio de 2019.

López, E. (2010). “Caracterización bioquímica del níspero (*Eriobotrya japonica*): Cinética de la polifenoloxidasas e identificación de compuestos fenólicos”. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México. México. Disponible en [https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD\\_10/Bioquimica/36.pdf](https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD_10/Bioquimica/36.pdf). Visitada el 18 de junio de 2019.

Luck, E. (2000). Conservación Química de los Alimentos en el campo de la Ciencia y tecnología de Alimentos. Editorial Acriba. Zaragoza – España. Capítulo 1 Introducción. p. 25 -27.

Macheix, J.J., Sapis, J.C. and Fleuriet, A. (1991). Phenolic compounds and polyphenol oxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30:441-486.

Mapama (2015). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: [http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/frutas/DOP\\_Nisperos.aspx](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/frutas/DOP_Nisperos.aspx). Visitada el 20 de junio de 2019.

Márquez, C.J., Cartagena, J.R. y Pérez, M.B. (2009). Efecto De Recubrimientos Comestibles Sobre La Calidad En Poscosecha Del Níspero Japonés (*Eriobotrya japonica* T.). En: issn 0121-4004issne 2145-2660, *vitae*, revista de la facultad de química farmacéutica. Vol. 16, pp. 304-310. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a04.pdf>. Visitada el 20 de junio de 2019.

Mayer, A.M. (1987). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26:11-20.

Misra, J. B., Sukumaran, N. P., and Verma, S. C. (1991). Reduction of cresolase and catecholase activities in tubers of some Indian potato varieties by the application of potash fertilisers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 54:339-345.

Nagy, S. y Shaw, P. E. (2000). Tropical and subtropical fruits. USA. AVI Publishing Company Inc. 479-88 p.

Nielsen, S. (2010). Análisis de los alimentos. Manual de laboratorio. Editorial Acribia Zaragoza. Cuarta edición. España

Ojima, M., Rigitano, O., Simao, S. and Ique, T. (2006). The effect of the type of fruit protection on the incidence of purple spot and fruit development in loquats. *Bragantia* 35: XIXLIV.

Oleszek, W., Chang, Y.L., Jaworski, A.W. and Price, K.R. (1989). Apple phenolics and their contribution to enzymatic browning reactions. *Acta Soc. Bot. Pol.* 58:273-283.

Pamplona, J. (2003). El poder medicinal de los alimentos. España: Safeliz, S.L, pp. 287. ISBN 84-7208-149-4.

- Price, K. R., Bacon, J. R., and Rhodes, M.J.C. (1997). Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucoside in onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:938-942
- Ramírez, E. R., Whitaker, J. R. and Virador, V. M. (2003). Polyphenol oxidase. En Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., and Wong, D. W. S. *Handbook of food enzymology*. United States of America. Marcel Dekker Inc. 22-30 p.
- Richard-Forget, F.C. and Gauillard, F. (1997). Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by combination of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 45:2472-2476.
- Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M. and Nicolás, J.J. (1992a). Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. Kinetic studies. *J. Agric. Food Chem.* 40:2108-2113.
- Richard-Forget, F.C., Rouet-Mayer, M.D., Goupy, P.M., Philippon, J. and Nicolas, J.J. (1992b). Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 40:2114-2122.
- Sapers, G.M. (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.* 47:75-84.
- Sahid, F. y Naczki, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. USA: CRC PRESS.
- Sancho, M. A., Milrad de Forchetti, S., Pliego, F., Valpuesta, V. and Quesada, M. A. (1996). Peroxidase activity and isoenzymes in the cultura medium of NaCl adapted tomato suspensión cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 44:161-167.

- Sannomaru, A., Katayama, O., Kashimura, Y., and Kaneko, K. (1998). Change in polyphenol content and polyphenol oxidase activity of apple fruit during ripening processes. *Jornal Japanese of Science and Technology*. 45:37-43.
- Sayavedra-Soto, T. and Montgomery, M. (1986). Inhibition of polyphenol oxidase by sulfite. *J. Food Sci.* 51:1531-1536.
- Sellés, S. (2007). Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. Algerie): enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas. Tesis de doctorado. Universidad de Alicante. Alicante. España. Disponible en [https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4085/1/tesis\\_doctoral\\_susana\\_selles.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4085/1/tesis_doctoral_susana_selles.pdf). Visitada el 20 de junio de 2019.
- Sepulveda, B. (2010). Efecto de inhibidores del pardeamiento enzimático en peras (*Pyrus Communis* L.) Cv. Packham's Triumph Mínimamente Procesadas. (Tesis para optar el grado). Universidad de Chile.
- Subramanian, N., Venkatesh, P. Ganguli, S. and Sinkar, V.P. (1999). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J. Agric. Food Chem.* 47:2571-2578.
- Tomás-Barberán, F. and Espín, J. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 81:853-876.

- Tuset, J., Rodríguez, A., Boronad, S., García, J. and Monteagudo, E. (1989). La mancha morada del níspero. Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Fullets Divulgació.
- Walker, M. and McKersie B. (1993). Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Pant Physiol.* 141:234-239.
- Wang, P., Zhang, B., Li, X., Xu, C., Yin, X., Shan, L., Ferguson, I. y Chen, K. (2010). Ethylene signal transduction elements involved in chilling injury in non-climacteric loquat fruit. *Journal of Experimental Botany*, vol. 61, no. 1, pp. 179-190. ISSN 00220957. DOI 10.1093/jxb/erp302.
- Wesche-Ebeling, P. and Montgomery, M.W. (1983). Extraction and partial characterization of strawberry polyphenol oxidase. *IFT Meet. , Abstr. , 43rd Annu* 295.
- Worthington, K. (1993). *Manual, Worthington Enzyme*. New Jersey, USA. Worthinhgtong Biochemical Corp.
- Yokotsuka, K., Nagao, A., Nakazawa, K. and Sato, M. (1999). Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabemet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years. *American Journal of enology and viticulture*. 50:1-12.
- Zappi, D. y Turner, J. (2001). *Eriobotrya japonica*. Bhetham- Moxon Turst. 108.
- Zhou, C.-H., Xu, C.-J., Sun, C.-D., Li, X. and Chen, K.-S. (2007). Carotenoids in white- and red-fleshed loquat fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:7822-7830.

## CAPÍTULO VII

### VII ANEXOS

#### ANEXO 1: muestra de Níspero



#### ANEXO 2: Pulpa entera de Níspero.





**ANEXO 3: Tratamientos**