

**Efecto del ácido etilendiaminatetraacético en
la actividad de la polifenol oxidasa en puré de
mango (*Mangifera indica* var. Haden)**

**Jeimy Alejandra Menjivar Polanco
Adriana Vanegas Torres**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto del ácido etilendiaminotetraacético en la actividad de la polifenol oxidasa en puré de mango (*Mangifera indica* var. Haden)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieras en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Jeimy Alejandra Menjivar Polanco
Adriana Vanegas Torres**

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Efecto del ácido etilendiaminotetraacético en la actividad de la polifenol oxidasa en puré de mango (*Mangifera indica* var. Haden)

Presentado por:

Jeimy Alejandra Menjivar Polanco
Adriana Vanegas Torres

Aprobado:

Jorge A. Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Juan A. Ruano, D.Sc.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto del ácido etilendiaminotetraacético en la actividad de la polifenol oxidasa en puré de mango (*Mangifera indica* var. Haden)

**Jeimy Alejandra Menjivar Polanco
Adriana Vanegas Torres**

Resumen: El mango es una fruta tropical estacionaria cuya vida anaquel es afectada por enzimas oxidoreductoras como la polifenoloxidasas (PFO) que degradan el color del fruto. La Planta Hortofrutícola de Zamorano maneja un inventario anual aproximadamente de 13,000 kg de pulpa de mango congelada para procesamiento. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de aplicación de EDTA y temperatura de almacenamiento en las propiedades fisicoquímicas del puré de mango. El estudio se realizó en dos fases. En la fase inicial se determinó la velocidad de reacción enzimática *in vitro* y el efecto del EDTA en la misma. En la segunda fase se evaluó estos efectos en el puré de mango a través del tiempo. Se usó un diseño de bloques completos al azar y arreglo factorial 3×3 con tres concentraciones de EDTA (0, 100 y 200 mg/L) a tres temperaturas de almacenamiento (10, 20 y 30 °C) y medidas repetidas en el tiempo (día 1, 3, 5 y 7). Las variables evaluadas (peso, viscosidad, sólidos solubles, pH y color) fueron afectadas por tiempo y condiciones de almacenamiento. Los tratamientos almacenados a 10 °C redujeron su peso por corrientes de aire en almacenamiento que incrementó su viscosidad y contenidos de sólidos solubles. La adición de EDTA (200 mg/L) mantuvo la luminosidad y coloración amarillenta hasta el día 5 y la viscosidad a lo largo del tiempo en almacenamiento a 30 °C. Se deben realizar estudios con adición de otros antioxidantes para evaluar el efecto sinérgico con EDTA que mejore la inhibición de la PFO.

Palabras clave: Cinética enzimática, empardeamiento enzimático, quelante.

Abstract: Mango is a tropical fruit stationary; its shelf life is affected by oxidative-reductive enzymes such as polyphenol oxidase (PPO) that degrade the fruit color. The Horticultural Plant Zamorano manages an inventory of about 13,000 kg of frozen mango puree annually for processing. The aim of the study was to evaluate the effect of EDTA application and storage temperature on the physico-chemical properties of mango puree. The study was conducted in two phases. The initial stage was to determine the rate of enzymatic reaction *in vitro* and the effects of EDTA. The second phase was to evaluate these effects in the mango puree over time. The experimental design was complete randomized blocks (CRB) and factorial arrangement 3×3 with three concentrations of EDTA (0, 100 and 200 mg /L), three storage temperatures (10, 20 and 30 °C) and repeated measures over time (day 1, 3, 5 and 7). The evaluated variables (weight, viscosity, soluble solids, pH, color) were affected by storage time and storage conditions. Treatments stored at 10 °C reduced its weight by air currents in storage increasing its viscosity and content of soluble solids. The addition of EDTA (200 mg/L) maintained brightness and yellowing until day 5 and viscosity over storage time at 30 °C. Studies should be performed with addition of other antioxidants to evaluate the synergistic effect with EDTA to improve PPO inhibition.

Key Words: Chelating, enzymatic browning, enzyme kinetics.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4 CONCLUSIONES.....	17
5 RECOMENDACIONES.....	18
6 LITERATURA CITADA.....	19

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de tratamientos para la aplicación de dos concentraciones de EDTA en diferentes temperaturas.	4
2. Diferencias en la Vmax y Km en la cinética de actividad enzimática a dos pH	6
3. Cambios de peso (gramos) a través del tiempo a las diferentes condiciones de almacenamiento.	9
4. Comportamiento de la Viscosidad en Pascal por segundo (Pa.s) a través del tiempo en los tratamientos.	11
5. Cambios en sólidos solubles (°Brix) a través del tiempo a las diferentes condiciones de almacenamiento.	12
6. Cambios de pH a través del tiempo y a las diferentes condiciones de almacenamiento.	13
7. Interacción de condiciones de almacenamiento, concentración de EDTA y tiempo en la luminosidad (L*) del color.	15
8. Interacción de las condiciones de almacenamiento, concentración de EDTA y tiempo en los cambios de valores a* del color.	15
9. Interacción de las condiciones de almacenamiento, concentración de EDTA y tiempo en los cambios de valores b* del color.	16
Figuras	Página
10. Gráfica Michaelis-Menten. Actividad de la PFO en diferentes concentraciones de Catecol (sustrato)	7
11. Actividad de la PFO a diferentes concentraciones de EDTA (inhibidor) con 2500 mg/L de Catecol (sustrato)	7

1. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica*) es una fruta con alto valor económico y con una distribución en el trópico (De la Cruz y García 2002), el cual tiene una elevada demanda por su calidad nutritiva, agradable color, sabor y olor. No obstante, tiene una vida de anaquel muy corta que afecta su comercialización y obliga a las industrias a desarrollar procesos de transformación para incrementar su valor agregado, vida anaquel y mejorar la comercialización (Reyes 2010). La estacionalidad del fruto permite a las industrias procesarlo para mayor disponibilidad, ya sea en forma de puré para elaborar otros productos como néctares, jugos, mermeladas, jaleas y algunos productos deshidratados. El puré puede ser conservado mediante medios fisicoquímicos, congelación o con enlatados para almacenarlos y facilitar el suministro de la materia prima en cualquier época del año (Enachescu 1995). El puré es de alta calidad y con características organolépticas muy similares al mango fresco. Además que se usa como materia prima para elaborar otros productos como mermeladas en la Planta Hortofrutícola de Zamorano (Reyes 2010).

El mango tiene elevado contenido de compuestos carotenoides, que son antioxidantes y precursores de vitamina A (Reyes 2010). Además, posee quinonas y xantonas que son compuestos fenólicos con grupos carbonilos no polimerizados, responsables del color de la fruta y susceptibles a deterioro por tratamiento térmico y oxidación, es decir que pueden provocar empardeamiento enzimático catalizado por polifenoloxidasas (PFO) produciendo oscurecimiento al contacto con el oxígeno (Rodríguez y Magro 2008). El empardeamiento se da debido a sustancias polifenólicas que se encuentran en vacuolas vegetales y que se oxidan debido a la PFO localizada en el citoplasma de las células vegetales. Al hacerle algún daño al fruto, ya sea en pelado, cortado, ataques fúngicos (Coultate 2002) golpes o en la madurez fisiológica, ponen en contacto las enzimas con el sustrato para que se lleve a cabo este empardeamiento (Crumière 2000).

La PFO conocida como catecol oxidasa, fenolasa o *o*-difenoil oxígeno reductasa, cataliza la oxidación de difenoles en presencia de oxígeno. La enzima posee cobre y lleva a cabo dos tipos de reacciones: la primera es la actividad cresolasa donde se da la oxidación de un monofenol a un orto-difenol y en la segunda reacción se da la actividad catecolasa que consiste en la oxidación de un *o*-difenoil a una *o*-quinona, donde las *o*-quinonas son muy reactivas y polimerizan fácilmente luego de su conversión espontánea enhidroxiquinonas (Coultate 2002). La PFO puede inhibirse por agentes metalo quelantes los cuales son agentes secuestradores que limitan el ion de cobre de la enzima que forma parte de su centro activo (Coultate 2002).

El mango se conserva mejor en cámaras con atmósferas controladas para regular la velocidad de respiración ya que el empardeamiento no solo altera el color del fruto, sino

que también se ven afectados el sabor y valor nutritivo por lo que se dice que este efecto causa una muerte comercial de los alimentos (Hernández 2009). Existen tratamientos para evitar el empardeamiento enzimático como químicos ya aceptados por la FDA GRASS como el 4-hexilresorcino y tratamientos combinados como el antes nombrado con ácido ascórbico que se ha usado en manzanas y papas cortadas. Además tratamientos como escaldado, reducción de temperaturas y/o oxígeno, atmósferas modificadas y hasta métodos de irradiación gama o altas presiones (Morales 2002).

El ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) forma complejos con metales de estructuras de coordinación octaédrica como el cobre del sitio activo de la PFO, inhibiendo así su actividad. Coordina metales pesados por cuatro posiciones acetato y dos amino haciendo un ligado hexadentado, formando compuestos coordinados cíclicos no iónicos, solubles en agua y virtualmente no dissociables (Gonzales 2012). Según la FDA en el CFR 21 pone limitantes en el uso de disódico EDTA como aditivo alimenticio dependiendo del tipo de alimento, y en el caso del puré de mango no se encuentran unas limitantes específicas para el uso de este quelante (FDA 2013).

Estudios han usado EDTA para mejorar el color de una leche fortificada con hierro (Hashimoto 2010) y combinaciones de EDTA con ácido cítrico o ascórbico para inhibir empardeamiento enzimático en manzanas mínimamente procesadas (Denoya *et al.* 2012). Otros estudios denotan que el EDTA tiene la capacidad de inhibir la PFO en el fruto del níspero (Sellés 2007). En Zamorano no se han realizado estudios sobre quelantes como antioxidantes en productos hortofrutícolas, por lo cual se medirá si el EDTA a concentración ideales puede captar el metal del centro activo de la polifenoloxidasas y evitar que el proceso de oxidación enzimática se lleve a cabo de manera acelerada y extender la vida anaquel del producto evitando cambios en las características organolépticas que representan pérdidas para la industria hortofrutícola.

La investigación es un aporte a la Planta Hortofrutícola, la cual tiene un inventario anual de 13,000 kg de pulpa de mango congelada. La Planta Hortofrutícola requiere al menos 26,000 kg de mango Haden que presentan un rendimiento de 50 - 60%, lo que lleva a una inversión de L. 91,000 en puré de mango. En el año 2012 problemas con los cuartos de congelación causaron pérdidas en calidad de un 20 a 25% de pulpa de mango congelada, ya que el choque de temperaturas causa una activación de la PFO y afecta la calidad de la materia prima y de sus subproductos, lo cual disminuye la aceptación de los consumidores y afecta de algún modo en las utilidades de la Planta Procesadora por las mermas en las ventas debido a la calidad.

Es por esta razón que el estudio tiene como objetivos:

- Determinar la velocidad de reacción enzimática de polifenoloxidasas y el efecto de EDTA en la misma.
- Evaluar el efecto del EDTA y temperaturas de almacenamiento en las características fisicoquímicas del puré de mango.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El puré de mango fue elaborado en la Planta Hortofrutícola de Zamorano y los análisis fisicoquímicos se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), ubicado en el Departamento de Agroindustria Alimentaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Metodología. El estudio se llevó a cabo en dos fases en el laboratorio. En la fase inicial se analizó *in vitro* el efecto que causa la concentración de sustrato en la actividad enzimática, donde se prepararon por triplicado las muestras de buffer de fosfato de sodio dibásico con catecol como sustrato a concentraciones de 0 a 2.5 g/L en pH de condiciones óptimas para la enzima de 6.8 y a pH de 4.0 para determinar la acción de la enzima al pH del mango. Se añadió la enzima (0.1 mL) vaciándola en una cubeta donde se tomaron los datos en el Espectrofotómetro (Spectronic® Genesys 5). Los datos se tomaron cada 10 segundos por 2 minutos. Seguidamente se aplicó el mismo método anterior a diferencia de que se agregó el EDTA a concentraciones desde 0 a 400 mg/L para observar el efecto de éste en la actividad enzimática haciendo la lectura de los datos por 2 minutos nuevamente.

Para determinar el comportamiento de reacción de la PFO se evaluaron gráficas como la de cinética de Michaelis-Menten el cual refleja la velocidad de la reacción contra la concentración del sustrato, formando una hipérbola como lo muestra la ecuación 1.

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{(K_m + S)} \quad [1]$$

Donde V_{\max} es la velocidad máxima donde la enzima reacciona a una concentración finita de sustrato y K_m es un parámetro constante de Michaelis-Menten que refleja la concentración de sustrato a la cual la enzima funciona a la mitad de la velocidad máxima (Bárcena *et al.* s.f). Se debe conocer el K_m para medir la velocidad que es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y para determinar esta constante y la V_{\max} se usa la gráfica de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos donde se trazan en una línea el recíproco de la velocidad frente al recíproco de la concentración de sustrato (Nielsen 1994), de aquí la V_{\max} es calculada como el recíproco del intercepto de la línea del eje $1/v$ y el K_m se obtiene multiplicando la pendiente de la línea K_m/V_{\max} por el V_{\max} descrito en la ecuación 2 (Down y Riggs 1964).

$$(1/v) = (1/V_{\max}) + (K_m/V_{\max}) \quad [2]$$

Además para tener una mejor referencia al realizar la fase final, se elaboraron pruebas preliminares con 250 mL de puré de mango puesto en bandejas de $5.25 \times 5.25 \times 1$ in, donde se aplicaron concentraciones de 0, 100 o 200 mg/L de EDTA y almacenándolos a temperatura de 20 o 30 °C por una semana. Es importante mencionar que en las primeras pruebas preliminares no se observaron cambios de color debido al crecimiento de hongos, por ende se decidió aplicar sorbato de potasio en un 0.2% como agente antimicrobiano tanto en las preliminares como en la fase final.

La fase final consistió en elegir las dos mejores concentraciones observadas ya sea en la fase inicial y/o en las preliminares, las cuales fueron aplicadas al puré de mango. Se sometieron a temperaturas controladas de 10, 20 o 30 °C y se analizaron a través del tiempo cada dos días por un período de 7 días para evaluar la actividad enzimática luego de aplicar el quelante. Se elaboraron 3 repeticiones del estudio a las temperaturas mencionadas debido a que en estas temperaturas la actividad enzimática ocurre en menos tiempo que en temperaturas de almacenamiento bajo 0 °C.

Cuadro 1. Descripción de tratamientos para la aplicación de dos concentraciones de EDTA en diferentes temperaturas.

Temperatura °C	EDTA (mg/L)		
	0	100	200
10	T1	T2	T3
20	T4	T5	T6
30	T7	T8	T9

Elaboración del puré de mango: El puré se elaboró a partir de mango de la variedad Haden que fue cosechado en el mes de mayo-junio. La materia prima fue recibida en la Planta Hortofrutícola y llevada al LAAZ para su procesamiento. Se tomaron 15 kg de mango y se lavaron para remover suciedad, se clasificaron para tener un producto con buenas características (madurez según el color de la cáscara y baja firmeza del fruto). Se removió la cáscara de la fruta y posteriormente se despulpó para obtener el puré con un pH de 4 aproximadamente y más de 14°Brix.

Se elaboró en cada repetición 7,500 mL de puré de mango del cual se tomaron 2,500 mL para cada concentración de EDTA (100 o 200 mg/L) y el control, los cuales fueron distribuidos en bandejas de $5.25 \times 5.25 \times 1$ in con capacidad de 250 g de puré de mango que es la cantidad necesaria para los análisis fisicoquímicos en cada medida de tiempo. Las bandejas se colocaron a las temperaturas controladas de 10, 20 o 30 °C por un período de 7 días, donde cada 2 días se evaluaron los cambios físicos y químicos que presentaba el puré, es decir, el progreso de la actividad enzimática con la adición del EDTA y a diferentes temperaturas en las variables de viscosidad, peso, pH, sólidos solubles y color del puré de mango.

Análisis de viscosidad. Se usó el viscosímetro de Brookfield modelo DV-II según ISO 1652:2004. Se tomó una muestra de 250 mL y se aplicó una velocidad de 10, 15 y 20 rpm. Los resultados fueron reportados en Pascal.segundo (Pa.s).

Análisis de concentración de sólidos solubles. Se evaluaron los grados sólidos solubles (°Brix) según la AOAC 932.14 con el refractómetro digital Atago (Morales 2009). Los resultados fueron dados en °Brix que según la literatura indica que el índice de sólidos solubles en el puré de mango debe ser de alrededor del 14.0% (Ramírez *et al.* 2010).

Análisis de pH. Se evaluó según el método de la AOAC 981.12, utilizando el potenciómetro Boeco Germany, PT - 70. Se tomaron 250 mL de puré de mango de cada concentración y temperatura. El pH es reflejado con la medición de potencial de hidrogeniones en el puré de mango.

Análisis de color. Se usó el Colorflex HunterLab L*a*b (Modelo 45/0) regido por la norma ASTM D6290 cuyo espacio de color es rectangular de 3 dimensiones basada en la teoría de los colores opuestos, en la cual se especifican el eje L que mide claridad de 0-100 (0= negro, 100=blanco), eje a (rojo=positivo, verde=negativo) y eje b (amarillo=positivo, azul=negativo) (Izasa y Hunter Lab 2001).

Se tomó muestras de cada concentración y de las tres temperaturas colocándolas en la copa especial del equipo. Con el uso del software del Colorflex HunterLab se obtuvo los componente L*, a* y b* que indicó el color del producto y por ende demostró si hubo reacción enzimática que afectara el color inicial del puré de mango.

Análisis estadístico. Se llevó a cabo un análisis por medio de un diseño por bloques completos al azar (BCA), un método de análisis de varianza (ANDEVA) con una separación de medias ajustadas LSMEANS con nivel de significancia del 95% ($P > 0.05$). Las repeticiones fueron los bloques debido a que se realizaron en distintas semanas.

El análisis se hizo en la fase inicial para determinar la velocidad de reacción de la enzima y el efecto de disminución de velocidad con la aplicación de EDTA. Asimismo este análisis estadístico se usó para evaluar los cambios fisicoquímicos presentados en los tres controles a tres temperaturas. Con las tres repeticiones evaluadas cuatro veces a través del tiempo se obtuvo un total de 108 unidades experimentales.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase inicial. Mediante espectrofotometría se midió la actividad de la PFO a ocho concentraciones de Catecol como sustrato (0 a 2,500 mg/L), donde a mayor concentración se ve el aumento de la velocidad de la reacción (Figura 1). A bajas concentraciones de sustrato la velocidad inicial es proporcional a la concentración, pero a concentraciones elevadas la velocidad de la reacción se refleja como la velocidad máxima (V_{max}), donde también se reconoce la constante de Michaelis-Menten (K_m) donde se refleja la concentración de sustrato a la cual la enzima funciona a la mitad de la velocidad máxima (Bárcena *et al* s.f). Según los dobles recíprocos o método de Lineweaver-Burk, se obtuvo que la V_{max} a pH de 6.8 es 69% mayor que a pH de 4.0 (Cuadro 2), por ende también bajó el K_m lo cual demuestra que a bajo pH la actividad enzimática es reducida.

Esta fase se desarrolló a dos niveles de pH (4.0 y 6.8) para resaltar el impacto que tiene la acidez de la fruta en la acción de la enzima. Se observó que la velocidad de actividad enzimática es menor cuando el ambiente es más ácido (Figura 1), debido a que a pH bajos hay alta concentración de H^+ que puede reaccionar con $-COO^-$ y formar $COOH$ que hace perder la carga del grupo y no hay interacción con otros grupos cargados de la proteína, por ende se modifica la matriz proteica que cambia el sitio activo de la enzima y puede causar de que esta ya no pueda unirse al sustrato presente en su ambiente (Sandava 2009).

Las enzimas son sensibles a temperaturas y pH por sus cadenas laterales de sus sitios activos (Sandava 2009). Asimismo, mientras aumentaron las concentraciones de sustrato la velocidad de la enzima fue mayor hasta alcanzar el punto de su velocidad máxima, donde a ambos pH se observa un comportamiento similar donde a menores concentraciones la actividad de la enzima es lineal pero al aumentar las concentraciones la enzima trabaja a su velocidad máxima.

Cuadro 2. Diferencias en la V_{max} y K_m en la cinética de actividad enzimática a dos pH.

Tratamiento	V_{max} (U/mL)	K_m (mM)
	MEDIA \pm D.E	MEDIA \pm D.E
pH 6.8	$0.004 \pm 1.66 \times 10^{-4}$ (a)	626.2 ± 40.5 (a)
pH 4.0	$0.003 \pm 2.67 \times 10^{-4}$ (b)	486.3 ± 101 (b)

^{a-b} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamiento de pH ($P < 0.05$). D.E: Desviación Estándar.

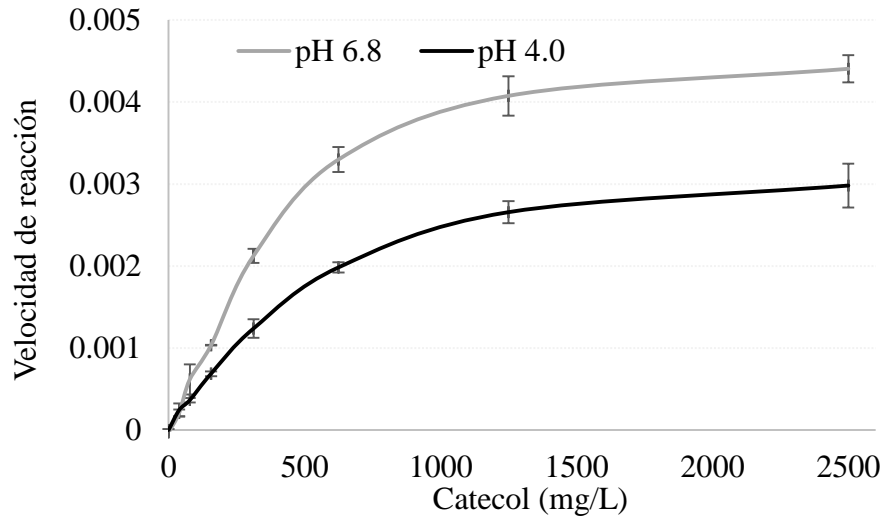


Figura 1. Gráfica Michaelis-Menten. Actividad de la PFO en diferentes concentraciones de Catecol (sustrato)

En otro aspecto existen inhibidores que forman enlaces covalentes con el centro activo de las enzimas que hacen que estas pierdan la capacidad para interactuar con el sustrato presente (Sandava 2009). Al realizar el estudio de espectrofotometría con la adición del inhibidor (EDTA), no se observaron diferencias significativas en la acción de inhibición que el EDTA presentaba ante la enzima (Figura 2), a pesar de que el único factor de variación fue el quelante al trabajar con la enzima a su velocidad máxima. Se usaron 8 concentraciones del quelante (0 a 400 mg/L) y además se hizo el análisis en pH 4.0 y 6.8, que de igual manera que la anterior demostró que la actividad enzimática tiene una menor velocidad de acción a pH bajos.

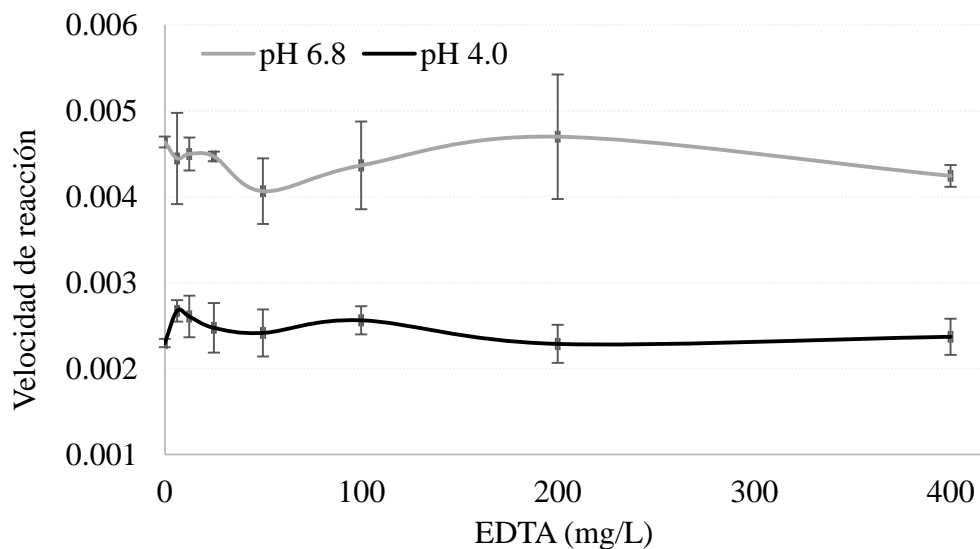


Figura 2. Actividad de la PFO a diferentes concentraciones de EDTA (inhibidor) con 2500 mg/L de Catecol (sustrato)

En este análisis no hubo diferencias significativas en las concentraciones de EDTA ($P=0.54$) por lo que no se vieron los resultados deseados ni se obtuvo una concentración ideal de EDTA para poder aplicar en el puré de mango, ya que no se observó una disminución marcada de la velocidad de la PFO, sólo se observa al igual que el análisis sin inhibidor de que la enzima actúa a menor velocidad a pH de 4.0.

Un factor que pudo influir en este análisis fue el uso de buffer de fosfato de sodio para las diluciones con la enzima, ya que el EDTA tiene afinidad a actuar con el sodio pero con una baja constante de estabilidad (Rodríguez 2008), lo que pudo limitar la actividad con el cobre porque al usar buffer para la preparación del sustrato, para diluir el EDTA y así mismo para bajar el pH pudo aumentar las concentraciones de iones de sodio y hacer que el quelante actuara más con éste que con el cobre del centro activo de la enzima que se encontraba en bajas concentraciones. En un estudio de caracterización de la PFO donde se probaron diez inhibidores diferentes en mamey, reflejan que el EDTA fue junto con el cloruro de sodio los que presentaron el nivel más bajo de inhibición, además dan a conocer que este quelante de iones metálicos tienen menos especificidad para el cobre aunque en otros estudios sí se ha mostrado inhibición de la PFO (Palma 2010).

Gasull y Becerra (2006) en un estudio de inhibición enzimática en pera y manzana reflejan que el ácido ascórbico fue el inhibidor más potente para la PFO, pero reportaron que este ácido actúa más como un antioxidante que como un inhibidor enzimático porque se oxida a ácido dehi-hidroascórbico que permite la reducción de la quinona a difenol antes de que comiencen a producir los pigmentos. Otro agente como el metabisulfito de sodio forma un producto de adición incoloro estable, tiene una acción similar al ácido ascórbico y además tiene un efecto directo en la enzima ya que puede ligar el centro activo de ésta e inhibirla (Sánchez y García 2010). Estudios muestran que el ácido ascórbico, el β -mercaptoetanol, L-cisteína y glicina resultaron tener mejor efectos inhibitorios de la PFO en mango (Wand *et al.* 2007) y en banana resulta ser mejor el ácido ascórbico donde el cobre no tiene ningún impacto en este inhibidor para que actúe, mientras que el EDTA tiene un efecto pobre de inhibición de la actividad enzimática (Yang *et al.* 2001).

Debido a que el estudio de espectrofotometría no dió una concentración ideal de EDTA para usar en los análisis de la segunda fase, se realizaron pruebas preliminares con el puré de mango donde se aplicaron concentraciones de 0, 100 y 200 mg/L de EDTA únicamente a temperaturas de 20 y 30 °C, con los cuales se determinó que esas concentraciones serían ideales para aplicarlas debido a que sí se hubieron diferencias visuales en los cambios de color de cada concentración pero no se realizó un análisis de color $L^*a^*b^*$ para determinar si verdaderamente existió una diferencia significativa en el color del puré de mango a estas concentraciones.

Fase final. Se elaboró el puré de mango adicionando las tres concentraciones de EDTA y almacenándolo a temperaturas de 10, 20 o 30 °C por 7 días en los cuales se analizaron las variables fisicoquímicas como: viscosidad, peso, pH, sólidos totales y color.

Peso. Las concentraciones de EDTA no tuvieron impacto en el cambio de peso ($P=0.32$), a diferencia de las condiciones y días de almacenamiento ($P<0.01$), donde en las tres

condiciones de almacenamiento se observó una pérdida de peso a partir del día 3, mostrando la mayor pérdida de peso a temperatura de 10 °C y la menor a 30 °C, es decir, mientras mayores fueron las corrientes de aire en almacenamiento, la pérdida de peso fue mayor (Cuadro 3) y se puede corroborar con la humedad relativa de estos ambientes que fueron de 50 a 28% a temperaturas de 30 a 10 °C respectivamente. La pérdida de peso fue generado por corrientes de aire presentes en las condiciones de almacenamiento donde a temperaturas de 30 °C no se vio efecto mayor en la pérdida de peso debido a que el almacenamiento se dio en una cámara de incubación con casi nula corriente de aire, mientras que a 10 y 20 °C los ambientes estuvieron expuestos a corrientes de aire que permitieron remover humedad del puré.

La pérdida de peso se ve afectada por tiempo y temperatura la cual está ligada a la humedad relativa y el aire (por su capacidad higroscópica) puesto que el aire toma el agua que los alimentos contienen y la evapora o remueve, lo que ocasiona pérdida de peso en los alimentos almacenados (Plank 2005). En un estudio se reportó que es importante la velocidad de circulación del aire cuando se almacenará por más tiempo, como por ejemplo un estudio sobre la pérdida de peso de carne congelada con circulación de aire por 10 meses donde se obtuvo que la carne perdió 70% más de peso al estar con circulación de aire que en ausencia de este (Plank 2005).

Cuadro 3. Cambios de peso (gramos) a través del tiempo a las diferentes condiciones de almacenamiento.

T ¹ (°C)	EDTA (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	250 ± 0.0 ^{a(x)}	237 ± 4.0 ^{a(xy)}	219 ± 5.1 ^{abc(y)}	173 ± 3.9 ^{bc(z)}
	100	250 ± 0.0 ^{a(x)}	237 ± 5.9 ^{a(xy)}	218 ± 0.1 ^{abc(y)}	179 ± 2.6 ^{bc(z)}
	200	250 ± 0.0 ^{a(x)}	237 ± 4.7 ^{a(x)}	217 ± 4.7 ^{bc(y)}	168 ± 2.3 ^{c(z)}
20	0	250 ± 0.0 ^{a(x)}	239 ± 1.6 ^{a(xy)}	221 ± 7.8 ^{abc(y)}	188 ± 36 ^{b(z)}
	100	250 ± 0.0 ^{a(x)}	239 ± 1.6 ^{a(x)}	213 ± 25 ^{c(y)}	187 ± 39 ^{bc(z)}
	200	250 ± 0.0 ^{a(x)}	240 ± 1.6 ^{a(xy)}	226 ± 4.2 ^{abc(y)}	177 ± 50 ^{bc(z)}
30	0	250 ± 0.0 ^{a(x)}	245 ± 3.6 ^{a(x)}	236 ± 2.3 ^{ab(xy)}	224 ± 7.0 ^{a(y)}
	100	250 ± 0.0 ^{a(x)}	247 ± 2.6 ^{a(x)}	240 ± 1.3 ^{a(xy)}	226 ± 0.7 ^{a(y)}
	200	250 ± 0.0 ^{a(x)}	245 ± 2.3 ^{a(xy)}	238 ± 2.2 ^{ab(xy)}	225 ± 2.4 ^{a(y)}
C.V (%)		0.00	0.90	4.21	11.4

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05). C.V: Coeficiente de Variación.

Viscosidad. La viscosidad fue afectada por el factor de condiciones y tiempo de almacenamiento (P<0.05), mas no por la concentración de EDTA (P=0.85). Las muestras en condiciones a 10 °C (28% HR) a partir del tercer día mostraron diferencias significativas con una tendencia en aumento de la viscosidad (Cuadro 4), lo cual puede

estar muy ligado a la pérdida de agua que concentró los sólidos, de igual manera a 20 °C no hubo diferencias significativas de la viscosidad aunque se observara un leve aumento, esto puede estar ligado a la pérdida de agua que provoca una concentración de sólidos.

Navas (2006) y Osorio (2008) demostraron que la temperatura y cizalla influyen en la cantidad de sólidos totales, sólidos solubles y tamaño de partícula que están directamente relacionados con la viscosidad. El mango que se almacena en puré, se le aplica una fuerza de cizalla haciendo que sus partículas generen una mayor área de contacto para que la temperatura y humedad relativa acentúen su efecto directamente, por tanto las condiciones en el almacenamiento como la temperatura, modifica la fracción de pectina (agente espesante) que contiene el mango en un 17.6%, despolimerizandola por acción de enzimas como la Pectilmetilestearasa (PME), poligalacturonasa y celulasa (Roe y Bruemmer 1981).

Las sustancias pectinas son hidrofílicas y forman una matriz ligadora de agua (Vaclavik y Crhistian 2002) que al desprenderse disminuye la firmeza o viscosidad del fruto. La PME degrada sustancias pécticas, hace perder la estabilidad de los jugos vegetales y libera ácido poligalacturónico donde actúa la poligalacturonasa que rompe enlaces α - (1-4) (Proctor y Miesle 1991). La enzima actúa a mayor velocidad mientras el fruto va madurando lo que genera pérdida de viscosidad (Melford y Dey 1986). Asimismo la celulasa que rompe enlace β - (1,4) de la celulosa hace perder la firmeza en la estructura de la pulpa (Vaclavik y Crhistian 2002).

A 30 °C pudo ser que la pectil-metilestearasa actuara debido a que la viscosidad fue descendiendo, sin embargo a 200 mg/L de EDTA en los días 3 y 7 se observa que el cambio de viscosidad es menor que en ausencia de este, factor en el que podría influir a que la enzima actúa con iones de calcio del medio para formar complejos y dejando libre más grupos carboxilos que cambien pH y cargas en las paredes celulares y que puedan ser atacados por la poligalacturonasa (Anthon y Barret 2002), pero como el EDTA tiene gran afinidad al calcio (Rodríguez 2008), a 200 mg/L el calcio puede estar interactuando más con el quelante que con la PME, haciendo que se generan menores cantidades de grupos carboxilos que puedan interactuar con la poligalacturonasa en la degradación de compuestos que disminuyen la viscosidad.

Por otro lado, la PME hidroliza el enlace metiléster de la pectina para formar esos ácidos pectídicos y metanol, por lo cual se puede inferir que a temperaturas de 10 y 20 °C al presentar pérdida de agua, la capacidad de hidrólisis de la enzima disminuye, por consiguiente, si ésta no actúa de manera normal el EDTA tampoco va a tener un efecto limitante en su acción.

Cuadro 4. Comportamiento de la Viscosidad en Pascal por segundo (Pa.s) a través del tiempo en los tratamientos.

T ¹ (°C)	EDTA (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	6.86 ± 1.0 ^{a(x)}	8.76 ± 1.5 ^{ab(xy)}	9.07 ± 1.9 ^{ab(xy)}	10.35 ^{a(y)}
	100	6.56 ± 0.9 ^{a(x)}	9.72 ± 2.0 ^{a(y)}	9.50 ± 1.5 ^{a(y)}	10.22 ^{a(y)}
	200	6.76 ± 0.2 ^{a(x)}	8.65 ± 2.1 ^{ab(xy)}	9.33 ± 3.1 ^{a(xy)}	10.25 ^{a(y)}
20	0	6.86 ± 1.0 ^{a(x)}	5.85 ± 0.7 ^{cd(x)}	8.31 ± 2.3 ^{ab(x)}	9.66 ± 0.3 ^{ab(x)}
	100	6.56 ± 0.9 ^{a(x)}	6.75 ± 1.5 ^{bcd(x)}	7.23 ± 0.6 ^{abc(x)}	7.88 ± 0.4 ^{bcd(x)}
	200	6.76 ± 0.2 ^{a(x)}	7.33 ± 0.8 ^{b(x)}	8.78 ± 2.3 ^{ab(x)}	8.36 ± 2.0 ^{abc(x)}
30	0	6.86 ± 1.0 ^{a(x)}	4.70 ± 0.5 ^{d(y)}	6.84 ± 3.0 ^{bc(x)}	4.85 ± 0.7 ^{e(y)}
	100	6.56 ± 0.9 ^{a(x)}	7.07 ± 1.9 ^{bc(x)}	5.38 ± 0.9 ^{c(x)}	6.14 ± 1.3 ^{de(x)}
	200	6.76 ± 0.2 ^{a(x)}	5.57 ± 1.6 ^{d(x)}	7.27 ± 2.6 ^{abc(x)}	7.52 ± 2.0 ^{cd(x)}
C.V (%)		12.7	9.77	18.3	18.5

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05). C.V: Coeficiente de Variación.

No existió una relación directa entre la concentración de sólidos y viscosidad (P=0.30), aunque estos contribuyen como moléculas que ligan agua y que permiten la formación de geles. Los purés de frutas son fluidos pseudoplásticos de clasificación no newtonianos que se caracterizan por una disminución de su viscosidad y de su esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (Ibarz y Manayay 2010).

La pérdida de viscosidad fue afectada mayormente por la pérdida del peso debido a la remoción de agua del puré por las corrientes de aire presentes en almacenamiento de 10 y 20 °C, asimismo se pudo notar el ligero aumento de los sólidos solubles que no fue significativo en la viscosidad a como lo fue la pérdida de peso, aunque es afectada por sólidos totales cuando la cantidad de estos es significativamente alto y más aún cuando contienen más sólidos como cuando se adicionan azúcares, caso que no se hizo en el estudio porque sólo se hace al realizar un producto usando el puré como son las mermeladas, donde el azúcar genera una menor cantidad de líquido en la matriz del alimento.

Por otro lado, cuando se encuentran productos con 68°Brix y un pH bajo como por ejemplo 3.0 esto provocará que se genere una sinéresis y si son pH arriba de 3.6 se generará una gelificación defectuosa. En el estudio el incremento leve de sólidos solubles pudo haber ocasionado una mayor interacción con los ácidos del puré como el galacturónico que es alto en el mango y esto generó un aumento en la viscosidad ya que la pectina es una cadena de ácidos galacturónicos (Camacho s.f).

Sólidos Solubles. El EDTA no tuvo influencia en la variación de los sólidos solubles (P=0.16) ya que no se vinculó con factores que influyen en la disminución o aumento de estos. Los factores que influyeron fueron igualmente las condiciones y el tiempo de

almacenamiento ($P < 0.01$), donde se observa que en almacenamiento a temperatura de 30 °C no hubieron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles en ausencia y a 100 mg/L de EDTA a diferencia de condiciones a 10 °C donde a partir del día 3 los sólidos comenzaron a incrementar igual que el día 5 a 20 °C (Cuadro 5). La influencia que tienen las condiciones en ciertas temperaturas y el tiempo de almacenamiento en el mango es alta, debido a que los frutos almacenados a menor temperatura pueden disminuir la actividad enzimática y la maduración se dará de manera más lenta (Galvis *et al.* 2002).

A diferencia de lo mencionado se observó que en 30 °C los sólidos totales fueron menores en comparación a 10 °C. Esto se debe a las diferencias de las condiciones en las temperaturas de almacenamiento, debido a que los tratamientos a 10 °C se coloraron en refrigeración y a 20 °C en un cuarto con aire acondicionado donde había flujo de aire constante que hizo que se evaporara agua libre del puré, concentrando así los sólidos solubles del producto, mientras que a 30 °C las muestras estuvieron en una cámara de incubación con muy poco flujo de aire que permitió la maduración por la alta temperatura pero no la pérdida de agua que causó que los sólidos solubles fueran menores que a las temperaturas de 10 y 20 °C. Por otro lado los sólidos solubles aumentan a medida que aumenta la pérdida de agua como se ve a 10 °C e influye también en la disminución del pH del fruto (Gaspareto 2004).

Cuadro 5. Cambios en sólidos solubles (°Brix) a través del tiempo a las diferentes condiciones de almacenamiento.

T ¹ (°C)	[EDTA] (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	17.1 ± 0.2 ^{a(x)}	17.3 ± 0.6 ^{abc(x)}	17.8 ± 1.2 ^{bc(x)}	19.8 ± 1.8 ^{a(y)}
	100	16.8 ± 1.1 ^{a(x)}	19.0 ± 3.1 ^{a(y)}	16.2 ± 0.6 ^{c(x)}	18.7 ± 0.2 ^{abc(y)}
	200	16.1 ± 1.36 ^{a(x)}	16.6 ± 0.5 ^{bc(xy)}	17.8 ± 0.4 ^{ab(yz)}	19.1 ± 2.5 ^{ab(z)}
20	0	17.1 ± 0.2 ^{a(x)}	18.7 ± 1.9 ^{ab(x)}	3 ———	17.9 ± 1.9 ^{abcd(x)}
	100	16.8 ± 1.1 ^{a(x)}	18.0 ± 1.9 ^{abc(x)}	21.2 ± 7.3 ^{a(y)}	17.8 ± 1.6 ^{bcd(z)}
	200	16.1 ± 1.4 ^{a(x)}	17.0 ± 1.1 ^{bc(xy)}	19.9 ± 3.9 ^{ab(y)}	18.7 ± 0.5 ^{abcd(y)}
30	0	17.1 ± 0.2 ^{a(x)}	16.9 ± 1.9 ^{bc(x)}	17.7 ± 0.7 ^{bc(x)}	17.1 ± 1.3 ^{d(x)}
	100	16.8 ± 1.1 ^{a(x)}	16.4 ± 2.3 ^{c(x)}	17.1 ± 1.3 ^{bc(x)}	17.5 ± 0.2 ^{bcd(x)}
	200	16.1 ± 1.4 ^{a(x)}	16.6 ± 0.4 ^{bc(xy)}	17.7 ± 0.6 ^{bc(y)}	17.2 ± 1.8 ^{cd(y)}
C.V (%)		3.66	5.03	4.17	6.09

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0.05$). C.V: Coeficiente de Variación.

³ Dato perdido

pH. Estadísticamente el factor pH fue afectado por las condiciones de almacenamiento y el tiempo ($P < 0.01$), no así por la concentración de EDTA ($P = 0.32$). Se puede observar que entre tratamientos no hubo diferencias significativas en el tiempo a temperaturas de 10 °C mostrando una mayor estabilidad del pH, mientras que a 20 y 30 °C el pH disminuyó a

través del tiempo demostrando diferencias significativas a partir del día 5 de almacenamiento a concentraciones de 100 y 200 mg/L (Cuadro 6). Donde no hubo aplicación de EDTA el pH se mantiene, mientras que con la aplicación de 100 o 200 mg/L el pH disminuyó en el último día, lo que puede estar ligado a que el quelante genera una interacción con el centro activo de la enzima para separar por diálisis el cobre del centro activo de la PFO (Hernández 2009), permitiendo la liberación de otros compuestos entre los que podrían estar algunos ácidos de las células, que aunque la concentración de EDTA no fue estadísticamente significativa ($P=0.32$), la presencia de este se podría considerar en el cambio de pH.

Cuadro 6. Cambios de pH a través del tiempo y a las diferentes condiciones de almacenamiento.

T ¹ (°C)	EDTA (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	5.0 ± 0.3 ^{a(x)}	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	5.1 ± 0.1 ^{a(x)}
	100	4.9 ± 0.3 ^{a(x)}	5.0 ± 0.3 ^{a(x)}	5.0 ± 0.2 ^{a(x)}	4.9 ± 0.1 ^{ab(x)}
	200	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	5.1 ± 0.1 ^{a(x)}	5.0 ± 0.1 ^{a(x)}	5.0 ± 0.1 ^{a(x)}
20	0	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	5.1 ± 0.2 ^{a(x)}	4.5 ± 0.3 ^{bc(x)}	4.6 ± 0.1 ^{bc(x)}
	100	4.9 ± 0.3 ^{a(x)}	5.0 ± 0.1 ^{a(x)}	4.7 ± 0.2 ^{ab(xy)}	4.4 ± 0.1 ^{c(y)}
	200	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	4.8 ± 0.6 ^{a(x)}	4.4 ± 0.2 ^{bc(y)}	4.5 ± 0.2 ^{c(y)}
30	0	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	4.8 ± 0.3 ^{a(x)}	4.7 ± 0.4 ^{abc(x)}	4.6 ± 0.6 ^{bc(x)}
	100	4.9 ± 0.3 ^{a(x)}	4.9 ± 0.1 ^{a(x)}	4.6 ± 0.1 ^{abc(xy)}	4.4 ± 0.2 ^{c(y)}
	200	4.9 ± 0.2 ^{a(x)}	4.8 ± 0.2 ^{a(x)}	4.2 ± 0.2 ^{c(y)}	4.3 ± 0.4 ^{c(y)}
C.V (%)		0.63	4.25	4.53	5.33

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($P<0.05$) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo ($P<0.05$). C.V: Coeficiente de Variación.

Estudios sobre el efecto que tiene el almacenamiento en las propiedades fisicoquímicas del mango reflejan que el porcentaje de acidez titulable decreció a los 15 días de almacenamiento a temperaturas de 32-35 °C debido a la degradación del ácido cítrico que se podría dar por el incremento de la actividad del ácido cítrico glyoxilasa durante la maduración o se da por la conversión a azúcares (Ahmed *et al.* 2007). Esto se contradice en este estudio donde se observó que la acidez del mango aumentó en condiciones de 20 y 30 °C, situación que puede darse por mezclas de varios agentes que dan acciones sinérgicas que penetran en los tejidos y modifican la estructura del centro activo de la PFO, causando las disminuciones del pH y aparición de procesos competitivos entre inhibidores, enzimas y sustratos (Hernández 2009).

Asimismo el EDTA reacciona con el sorbato a pH bajo (3.5) degradándolo (Castro *et al.* 2005), pero en el estudio no lo degradará completamente por las diferencias de concentraciones en ambas. Es importante mencionar que en la elaboración de puré de mango se adicionó sorbato de potasio, el cual impide crecimiento de hongos filamentosos

en alimentos ácidos ya que son los más susceptibles al ataque de estos hongos (Tortora *et al.* 2007), y por otro lado este compuesto comúnmente reduce el pH de los alimentos para favorecer su actividad de conservante (Flores *et al.* 2002).

En el estudio sólo se aplicó conservante para detener el crecimiento de hongos en el puré ya que crecen a un rango de pH más amplio, pero no se realizó ninguna evaluación microbiológica sobre crecimiento de bacterias, ya que a las temperaturas en las que se tenía almacenado el puré de mango podría ser un factor para el crecimiento de bacterias psicrótofas que crecen a temperaturas de 0 °C pero su temperatura óptima de crecimiento va hasta los 20-30 °C o las bacterias mesófilas que crecen óptimamente a temperaturas de 25 a 40 °C y son los tipos más comunes de microbios. Por otro lado las bacterias crecen a un rango de pH más limitados que los hongos y levaduras, pero en este caso podrían crecer las bacterias acidófilas (Tortora *et al.* 2007) que crecen a un rango de pH de 0 a 5 (Merino s.f). Se debe de considerar la evaluación de todos los microorganismos que puedan crecer en este medio de puré a pH < 4.6 como son los mohos y levaduras, mesófilos aerobios y coliformes totales (Meljem 1995)

Color. En los valores de L*a*b* tuvo influencia las condiciones de almacenamiento, tiempo y concentración. En el primer día las tres coordenadas del color fueron significativamente iguales. En el valor L* (Cuadro 7) la temperatura de 20 y 30 °C presentaron diferencias estadísticas a partir del día 3 disminuyendo notablemente la luminosidad del color en el puré. No hubo diferencias entre las concentraciones de EDTA excepto a 200 mg/L en el día 5 a 30 °C, donde se observa que la disminución de luminosidad fue menor en comparación a las otras concentraciones, por ende se observó que en cierto tiempo el EDTA a la mayor concentración si tuvo un efecto en retardar la pérdida de luminosidad en el puré.

Por otro lado la mayor intensidad del color se presentó en las condiciones de 10 °C según el análisis de separación de medias y se observó que el color y la intensidad fueron iguales significativamente a lo largo del tiempo y sin importar la concentración. Una disminución en los valores L* quiere decir que está perdiendo luminosidad y está muy asociado a un aumento en el pardeamiento enzimático (Rocha y Morais 2003). Asimismo en la coordenada a* no hay diferencias significativas en los cambios de color, es decir que no se observaron cambios en el color rojo de la coordenada con el uso de EDTA, pero sí en temperaturas de 30 °C muestran los valores más bajos con respecto a las otras condiciones de almacenamiento a 10 y 20 °C (Cuadro 8).

Cuadro 7. Interacción de condiciones de almacenamiento, concentración de EDTA y tiempo en la luminosidad (L*) del color.

T ¹ (°C)	EDTA (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	50.0 ± 0. ^{a(x)}	48.1 ± 0.4 ^{abc(x)}	47.6 ± 0.9 ^{a(x)}	46.7 ± 2.8 ^{abc(x)}
	100	49.9 ± 0.5 ^{a(x)}	49.4 ± 1.4 ^{a(x)}	47.4 ± 0.1 ^{a(x)}	47.2 ± 0.2 ^{ab(x)}
	200	50.4 ± 0.5 ^{a(x)}	48.9 ± 1.4 ^{ab(x)}	48.9 ± 0.6 ^{a(x)}	47.3 ± 1.9 ^{a(x)}
20	0	50.0 ± 0.7 ^{a(x)}	40.7 ± 5.1 ^{de(y)}	43.9 ± 4.2 ^{a(y)}	41.4 ± 4.8 ^{cd(y)}
	100	49.9 ± 0.5 ^{a(x)}	42.7 ± 4.1 ^{cde(y)}	47.1 ± 0.0 ^{a(y)}	41.7 ± 3.5 ^{bcd(y)}
	200	50.4 ± 0.52 ^{a(x)}	43.7 ± 5.0 ^{bcde(y)}	47.1 ± 1.0 ^{a(y)}	44.6 ± 4.5 ^{abc(y)}
30	0	50.0 ± 0.7 ^{a(x)}	43.4 ± 7.6 ^{cde(y)}	34.6 ± 1.5 ^{b(z)}	37.8 ± 3.6 ^{de(z)}
	100	49.9 ± 0.5 ^{a(x)}	39.9 ± 0.5 ^{e(y)}	37.5 ± 1.9 ^{b(y)}	34.4 ± 2.9 ^{e(y)}
	200	50.4 ± 0.5 ^{a(x)}	46.0 ± 4.4 ^{abcd(xy)}	44.5 ± 0.1 ^{a(y)}	34.8 ± 0.8 ^{e(z)}
C.V (%)		0.16	9.60	3.93	7.83

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05). C.V: Coeficiente de Variación.

Cuadro 8. Interacción de las condiciones de almacenamiento, concentración de EDTA y tiempo en los cambios de valores a* del color

T ¹ (°C)	EDTA (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	13.8 ± 0.4 ^{a(x)}	12.8 ± 0.3 ^{ab(x)}	12.8 ± 0.2 ^{abcd(x)}	13.7 ± 1.4 ^{abc(x)}
	100	13.2 ± 1.1 ^{a(x)}	14.1 ± 0.5 ^{a(x)}	13.0 ± 0.6 ^{abcd(x)}	15.2 ± 0.9 ^{a(x)}
	200	14.4 ± 0.2 ^{a(x)}	14.2 ± 0.8 ^{a(x)}	15.3 ± 0.6 ^{a(x)}	15.1 ± 2.3 ^{ab(x)}
20	0	13.8 ± 0.4 ^{a(x)}	10.5 ± 2.3 ^{b(y)}	11.6 ± 0.3 ^{bcde(y)}	13.1 ± 4.2 ^{abc(y)}
	100	13.2 ± 1.1 ^{a(x)}	12.1 ± 0.5 ^{ab(x)}	13.9 ± 0.9 ^{abc(x)}	13.7 ± 1.5 ^{abc(x)}
	200	14.4 ± 0.2 ^{a(x)}	12.4 ± 1.2 ^{ab(x)}	14.4 ± 0.7 ^{ab(x)}	15.6 ± 2.8 ^{a(x)}
30	0	13.8 ± 0.4 ^{a(x)}	10.2 ± 1.0 ^{b(y)}	8.90 ± 0.7 ^{e(y)}	12.1 ± 3.3 ^{cd(y)}
	100	13.2 ± 1.1 ^{a(x)}	10.9 ± 1.9 ^{b(xy)}	10.9 ± 0.9 ^{de(xy)}	9.70 ± 2.1 ^{d(y)}
	200	14.4 ± 0.2 ^{a(x)}	13.0 ± 0.8 ^{ab(xy)}	11.2 ± 0.7 ^{cde(y)}	12.2 ± 2.2 ^{bcd(y)}
C.V (%)		0.39	0.86	0.35	1.86

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05). C.V: Coeficiente de Variación.

En las condiciones de almacenamiento a 10 °C se mantuvieron significativamente los valores de b* en todas las concentraciones, mientras que en las condiciones de 20 y 30 °C a partir del día 3 se observan cambios en estos valores con una tendencia a disminuir, siendo aun así la mayor concentración de EDTA la que mantuvo de mejor manera el color amarillo (coordenada b*) en el día 5 al igual que la luminosidad (Cuadro 9).

Un punto importante es que a la mayor concentración de EDTA en el día 5 y a 30 °C, se observó que mantuvo mejor tanto la luminosidad como el color amarillo del mango, cabe resaltar que este efecto se dio en las muestras que obtuvieron los menores valores de pH, donde estudios demuestran que el pH es un factor muy importante tanto en la estabilidad de los carotenoides como en la acción del EDTA, ya que a menor pH algunos de carotenoides son muy inestables y cambian el perfil de carotenoides contenidos en el mango, lo que genera cambios de coloración en el fruto y asimismo la temperatura tiene un efecto, ya que al aumentar en almacenamiento disminuye los niveles de carotenoides generando así una desestabilización del color (Meléndez-Martínez *et al.* 2004).

Por otro lado el efecto del EDTA se pudo ver acentuado en las condiciones de 30 °C debido a que actúa con iones metálicos en soluciones acuosas por la solubilidad de éste (Segura *et al.* 1997), donde a esta temperatura se perdió menor cantidad de agua generando un complejo del EDTA más estable. El efecto del EDTA sólo pudo observarse al día 5, donde se puede inferir que el efecto del quelante es limitado al igual que el ácido ascórbico (Sellés 2007).

Cuadro 9. Interacción de las condiciones de almacenamiento, concentración de EDTA y tiempo en los cambios de valores b* del color

T ¹ (°C)	EDTA (mg/L)	Tiempo (Días)			
		1	3	5	7
		MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E	MEDIA±D.E
10	0	30.3±0.6 ^{a(x)}	29.1 ± 0.1 ^{abc(x)}	28.6 ± 0.8 ^{ab(x)}	28.4 ± 2.2 ^{ab(x)}
	100	30.3 ± 0.9 ^{a(x)}	30.1 ± 0.8 ^{a(x)}	28.6 ± 0.2 ^{ab(x)}	28.9 ± 0.1 ^{a(x)}
	200	30.7 ± 0.7 ^{a(x)}	29.8 ± 0.8 ^{ab(x)}	29.9 ± 0.2 ^{a(x)}	29.0 ± 1.0 ^{a(x)}
20	0	30.3 ± 0.6 ^{a(x)}	23.8 ± 3.8 ^{de(y)}	25.9 ± 2.5 ^{b(y)}	24.4 ± 3.8 ^{cd(y)}
	100	30.3 ± 0.9 ^{a(x)}	25.3 ± 2.8 ^{cde(y)}	28.3 ± 0.1 ^{ab(y)}	24.6 ± 2.5 ^{bcd(y)}
	200	30.7 ± 0.7 ^{a(x)}	26.0 ± 3.8 ^{bcd(y)}	28.3 ± 1.0 ^{ab(y)}	26.8 ± 3.3 ^{abc(y)}
30	0	30.3 ± 0.6 ^{a(x)}	25.6 ± 5.0 ^{cde(y)}	19.2 ± 1.2 ^{c(z)}	21.6 ± 2.9 ^{de(z)}
	100	30.3 ± 0.9 ^{a(x)}	23.2 ± 0.1 ^{e(y)}	21.7 ± 1.1 ^{c(y)}	19.2 ± 2.3 ^{e(y)}
	200	30.7 ± 0.7 ^{a(x)}	27.6 ± 2.8 ^{abcd(xy)}	26.4 ± 0.2 ^{ab(y)}	20.0 ± 0.8 ^{e(z)}
C.V (%)		0.08	1.92	0.75	1.66

¹Temperatura de almacenamiento. ^{a-d} Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05) ^(x-z) Letras iguales entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05). C.V: Coeficiente de Variación.

Los cambios de coloración en el almacenamiento de frutas suelen darse por enzimas como la PFO, pero cuando se utilizan compuestos inhibidores como el EDTA otras reacciones se presentan como el empardeamiento por reacción de Maillard (Turcios y Gordón 2012), reacciones no enzimáticas que se presentan en mayor intensidad a temperaturas altas y que también puede darse a temperaturas de refrigeración (4-7 °C), donde la tasa de la reacción de Maillard disminuye pero no se detiene por completo, ocasionando así un cambio de coloración (Quintero *et al* 2012).

4. CONCLUSIONES

- La velocidad de actividad enzimática se reduce a pH bajos pero tanto a pH de 6.8 como a 4.0 la curva de velocidad enzimática sigue una misma tendencia de reacción.
- La aplicación de EDTA *in vitro* no presentó una función inhibitoria en la velocidad de acción de la PFO.
- Los cambios en las condiciones de almacenamiento influyeron en la viscosidad, peso, sólidos solubles y pH del puré de mango.
- La adición de EDTA mantuvo la luminosidad y el color amarillo (coordenada b*) durante 5 días y la viscosidad a lo largo del tiempo en condiciones de almacenamiento a 30 °C con 50% de humedad relativa.
- La aplicación de un análisis de regresión no mostró resultados objetivos en la predicción de vida anaquel del puré de mango debido a que el comportamiento de los datos no siguió una tendencia lineal por la alta variabilidad en el estudio.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio en ambientes con condiciones similares de almacenamiento.
- Aplicar combinaciones de agentes antioxidantes con EDTA que permitan tener un mejor efecto del control enzimático.
- Validar los datos obtenidos con un estudio en tiempos reales que permita tener una predicción objetiva de la vida anaquel del puré de mango en condiciones de almacenamiento a temperaturas menores a -10 °C.
- Predecir la vida anaquel del puré de mango con EDTA a través de la elaboración de un modelo de regresión.

6. ITERATURA CITADA

Ahmed, H., T. Masud, S. Sammi y A. Hussain. 2007. Effect of storage on physico-chemical composition and sensory properties of mango (*Mangifera indica* L.) variety Dosehari. Pakistan Journal of Nutrition 6(2): 143-148.

Anthon, G. E. y D. M. Barrett, 2002. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(14): 4119–4125.

Bárcena, J., C. García, C. Padilla, E. Martínez y J. Dapena. s.f. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina (en línea). Consultado el 5 de Septiembre 2014. Disponible en <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/30%20FOSFATASA%20ALCALINA.pdf>

Camacho, G. s.f. Procesamiento y Conservación de frutas (en línea). Dirección Nacional de Innovación Académica: Universidad Nacional de Colombia. Consultado el 13 de Octubre de 2014. Disponible en <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006228/teoria/obmerm/p3.htm>

Castro, M.P., L.N. Gerschenson and C.A. Campos. 2005. Stability of sorbates in the presence of EDTA: effect of pH, packaging material and sequestrant level. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 328-332.

Coultate, T. 2002. Manual de química y bioquímica de los alimentos. España: Editorial ACRIBIA S.A. 3 ed. 446 p.

Crumière, F. 2000. Inhibition of enzymatic browning in food products.. Department of Food Science and Agricultural Chemistry. M. Sc. McGill University. Montreal, Québec. 104 p.

De la Cruz, J. y H.S. García. 2002. Mango: Post-harvest Operations. Ed. Danilo Mejía, Beverly Lewis. Instituto Tecnológico de Veracruz, FAO. 69 p.

Denoya, G. I., M. Ardanaz, A.M. Sancho, C.E. Benítez, C. González y S. Guidi. 2012. Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. Revista de investigaciones agropecuarias 38 (3): 263-267.

Down, J. y D. Riggs. 1965. A comparison of estimates of Michaelis-Menten Kinetic constants from various linear transformations. *The Journal of Biological Chemistry* 240 (2): 863.

Enachescu, M. 1995. Fruit specific preservation technologies. *In: Fruit and vegetable processing*. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FDA (U.S Food and Drug Administration) 2013. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 Title 21, Volume 3 (en línea). Consultado 13 de Mayo de 2014. Disponible en <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.135>.

Flores, R., F. Martínez. y Y. Salinas. 2002. Caracterización de harinas comerciales de maíz nixtamalizado. *Agrociencia* 36 (5): 557-567.

Galvis, J., H. Arjona, G. Fisher, T. Landwehr y R. Martinez. 2002. Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la conservación del fruto de mango (*Mangifera indica L.*) variedad Van Dyke. *Agronomía Colombiana* 19 (1-2): 23-35.

Gaspareto, O., E. Oliveira, L. Da Silva y M. Magalhaes. (2004). Influencia del tratamiento osmótico en el secado de banana “nanica” (*Musa cavendishii, L.*) en secador de lecho fijo. *Información Tecnológica* 15(6): 9-16.

Gasull, E. y D. Becerra. 2006. Caracterización de polifenoloxidas extraída de pera (cv. Packam’s triumph) y manzana (cv. Red delicious). *Información tecnológica* 17(6): 69-74.

Gonzales, A. 2012. Agentes quelantes (secuestrantes) y antioxidantes (en línea). Consultado 27 de Julio 2014. Disponible en <http://prezi.com/pnlmceaxxhq/agentes-quelantes-secuestrantes-y-antioxidantes/>

Hashimoto, N.A. 2010. Efecto de la fortificación con hierro en un prototipo de bebida sabor naranja con lactosuero dulce. Ing., Agroindustrial, Zamorano, Honduras, Universidad Agrícola Panamericana. 27 p.

Hernández, C.E. 2009. Acción y Efecto de la polifenoloxidas en alimentos. Orizaba, Veracruz, Universidad Veracruzana. 72 p.

Ibarz, D. y D. Manayay 2010. Modelamiento de la cinética de reacciones del pardeamiento no enzimático y el comportamiento reológico, en el proceso térmico de jugos y pulpas de fruta. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Trujillo. 14p.

Izasa y Hunter Lab 2001. Principios básicos de medida y percepción de color (en línea). Consultado 26 de Abril de 2013. Disponible en <http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf>

Meléndez-Martínez, A.J., I.M. Viacrio y F.J. Heredia. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. Universidad de Sevilla- Sevilla, España. ALAN 54(2).

Melford, J. y P. Dey. 1986. Postharvest changes in fruit cell wall. *In*: Advances in Food Research. Academic Press, Orlando, Florida. C.O. Chichester 30: 139-193.

Meljem, M. J. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM- 130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en cierres de recipientes herméticos y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Estados Unidos Mexicanos.

Merino, L.A. s.f. Fisiología bacteriana. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste.

Morales, V. 2002. Science, Technology and Market (en línea). Consultado 15 de Mayo de 2014. Disponible en http://aromateca.com/main/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=80.

Morales, N. 2009. Desarrollo de un prototipo de mermelada light de mango utilizando sucralosa y sacarina como edulcorantes no calóricos. Ing., Agroindustrial. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 33 p.

Navas, J. 2006. Fundamentos de reología de alimentos (en línea). Consultado 5 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~dsa/Fundamentos%20de%20Reologia.pdf>

Nielsen, S. 1994. Application of enzymes in food analysis. *In*: Introduction to the chemical analysis of food. Indiana, Estados Unidos. p. 476.

Osorio, Mora. 2008. Influencia de tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa (*Fragaria x ananassa*, cv Camarosa). Tesis Ph.D., Valencia, España, Universidad politécnica Valencia. 145 p.

Palma, G. 2010. Caracterización de la polifenol oxidasa del mamey (*Pouteria sapota*) y control del oscurecimiento enzimático. Ph.D. Ciencias químico-biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 74 p.

Plank, R. 2005. La conservación de alimentos mediante frío El empleo del frío en la industria de la alimentación. Alemania, Springer Verlag. Berlín.

Proctor, A. y T. Miesle. 1991. Polygalacturonase and pectinmethylesterase activities in developing highbush blueberries. *HortScience* 26(5): 579-581.

Quintero, V., A. Duque y G. Giraldo. 2012. Evaluación de viscosidad y color en pulpa de mango común (*Mangifera indica L*) tratada enzimáticamente. *Dialnet plus* 17(2): 66-76.

- Ramírez, M.R., O. Quijada, G. Catellano, M.E. Burgos, R. Camacho, R.C. Marin. 2010. Características físicas y químicas de frutos de trece cultivares de mango (*Mangifera indica* L) en el municipio Mara en la planicie de Maracaibo. México, Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 10(2): 65-72.
- Reyes, N. 2010. Tecnología para aprovechamiento y conservación del mango Tommy Atkins (en línea). Consultado 25 de Abril de 2013. Disponible en http://www.fomixcampeche.gob.mx/documentos/articulos_04/focare_04_viento_mango.pdf.
- Rocha, A. y A. Morais. 2003. shelf life of minimally processed apple cv jonagored determined by colour changes. ELSEVIER Food Control Vol. 14: 13-20.
- Rodríguez, M. 2008. Limpieza superficial de pintura de caballete mediante soluciones acuosas de EDTA. Tesis Master. Universidad Politécnica de Valencia. 130 p.
- Rodríguez V.M. y E.S. Magro. 2008. Bases de la alimentación humana. Ed. Paola Paz. España, Editorial Netbiblo, S.L. 565 p.
- Roe, B. y J.H. Bruemmer. 1982. Changes in pectin substances and enzymes during ripening and storage of Keitt mangos : J. Food Sci. 46:186-189.
- Sánchez, A. y F. García. 2010. Activation and inhibition of grape polyphenol oxidase. Biochemical Education vol. 20(4): 235-236.
- Sandava, M. 2009. Energía, enzimas y metabolismos. *In: Vida, La ciencia de la Biología.* Trad. Fernández, S. *et al.* Buenos Aires, Argentina. 8th Edición, Editorial Médica Panamericana. p. 134.
- Segura, E.J., A. Rubio-Manzanares, R. Cadaval, y A. Jiménez. 1997. El ácido etilen diaminotetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. 2(2): 8 p.
- Sellés, S. 2007. Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. Algerie): enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas. Ph.D. Química. Alicante, España, Universidad de Alicante. 196 p.
- Turcios, C. D. y X. E. Gordón. 2012. Desarrollo y evaluación de un puré concentrado de guayaba Taiwanesa (*Psidium guajava* L.) para bebidas. Tesis Ing. agroindustria alimentaria. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana.
- Tortora, G., B. Funke. y C. Case. 2007. Introducción a la microbiología. Trad. Rondinone *et al.* Médica Panamericana, 9^a ed., Buenos Aires, Argentina. 988 p.
- Vaclavik, V. y E. Christian. 2002. Cap 5 Pectinas y otros carbohidratos. *In: Fundamentos de ciencia de los alimentos.* p. 63-72

Wang, J., W. Jiang, B. Wang, S. Liu, Z. Gong, y Y. Luo. 2007. Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Magnifera indica* L. cv. "Tainong") pulp. *J. Food Biochem.* 31, 45-55.

Yang, C. P., S. Fujita, K. Kohno, A. Kusubayashi, M.D. Ashrafuzzaman y N. Hayashi. 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1446-1449.