

Evaluación de la actividad enzimática en pulpa de *Myrciaria dubia* HBK McVaugh (camu camu)

Evaluation of the enzymatic activity in pulp of *Myrciaria dubia* HBK McVaugh (camu camu)

Luz Liliana Silva Doza¹, Víctor Erasmo Sotero Solís², Ena Velazco Castro¹, Vilma Montero Celestino¹, María Luisa Passanezi Araujo Gómez³, Dora García de Sotero⁴ y Littman Gonzales Ríos⁵

Recibido: junio 2008

Aceptado: noviembre 2010

RESUMEN

Se evaluaron las actividades de las enzimas ascorbasa y peroxidasa en pulpa de *Myrciaria dubia* HBK McVaugh (camu camu) en tres estados de maduración: verde, pintón y maduro. Los frutos fueron almacenados en cámaras de frío a 5 °C y -20 °C por quince días. Las actividades enzimáticas de la ascorbasa y de la peroxidasa fueron influenciadas por los estados de maduración de los frutos y el tipo de almacenamiento, y presentaron su valor máximo al sexto y tercer día, cuando fueron almacenadas a 5 °C y -20 °C respectivamente.

Palabras claves: *Myrciaria dubia*, actividad enzimática, ascorbasa, peroxidasa.

ABSTRACT

The activities of the ascorbic and peroxide enzymes were evaluated in pulp of *Myrciaria dubia* HBK McVaugh (camu camu) in three maturing states: green, middle and mature. The fruits were put in cold stores at 5 °C and -20 °C for five days. The activities of the ascorbic and peroxide enzymes were influenced by the maturing stats of the fruit and by the type of storing. They presented its maximum value at the third and sixth day when they were stored at 5 °C and -20 °C respectively.

Key words: *Myrciaria dubia*, enzymatic activity, ascorbic, peroxide.

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia HBK McVaugh (camu camu), es un fruto nativo de la Amazonía peruana, que viene despertando gran interés en el área nutricional debido a su alto contenido de ácido ascórbico (vitamina C) compuesto, que el ser humano no lo puede

sintetizar y necesariamente debe ingerirlo en la dieta. Existen frutos con un promedio de 900-2800 mg / 100 g de ácido ascórbico, dependiendo del grado de maduración y otros factores ambientales, resultados que evidencian la superioridad de esta fruta en comparación con otras especies consideradas fuentes importantes de

¹ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú.

² Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú. Av. Abelardo Quiñones km 2,5. Iquitos, Perú. Correo electrónico: vsotero@iiap.org.pe

³ Faculdade de Ciências Farmaceuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil .

⁴ Departamento Académico de Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú .

⁵ Departamento Académico de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú.

vitamina C, como los cítricos acerola (*Malpighia glabra*) o rosa mosqueta (*Rosa eglanteria*), entre otras (Andrade *et al.*, 1991).

La vitamina C es muy sensible a diversas formas de degradación, entre las cuales se hallan la temperatura, variación del pH, oxígeno, concentración de sólidos, catalizadores metálicos, concentración inicial de ácido y la relación ácido ascórbico-ácido deshidroascórbico (su forma oxidada) y enzimas. En el caso de la pulpa de camu camu, su contenido de sólidos, pH y la presencia de enzimas, podrían viabilizar la degradación del ácido ascórbico (Cheftel y Cheftel, 1983).

Actualmente, muchos estudios desarrollados en diferentes frutos demostraron la presencia de enzimas, relacionándolos como indicadores de alteraciones metabólicas intrínsecas que se mantienen como desórdenes fisiológicos externos durante el periodo de maduración y almacenamiento (Pérez *et al.*, 1999).

Las enzimas muestran, a menudo, una marcada fragilidad térmica. Cuando se calientan a temperaturas superiores a 50 °C la mayoría de las enzimas, pero no todas, se desnaturalizan, y unas pocas muestran desnaturalización cuando se enfrían aproximadamente a 5 °C. A temperaturas bajas, la actividad enzimática procede muy lentamente, no se detiene del todo, hecho que debe tenerse en cuenta en la industria congeladora de alimentos. A menos que se inactiven previamente las enzimas objetables, la mayoría de los alimentos congelados experimentan un considerable deterioro después de un almacenamiento prolongado, porque a temperaturas tan bajas como -18 °C algunas reacciones enzimáticas siguen teniendo lugar (Badui, 1999).

Diversos estudios mencionan que el

almacenamiento de frutos a baja temperatura está relacionado con el incremento de la actividad enzimática de varias enzimas: polifenoloxidasas, peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, poligalacturonasas, pectinametilsterasas (Tejacal *et al.*, 2005).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad de las enzimas ascorbasa y peroxidasa de la pulpa del fruto de camu camu almacenado a 5 °C y -20 °C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Los frutos de camu camu se adquirieron en el mercado principal de la ciudad de Pucallpa, en los estados de maduración: verde, caracterizado por el color verde de la cáscara y su textura rígida; pintón, por el color rojo oscuro de la cáscara que predomina sobre el color verde (>50%) y maduro, con una cáscara de color rojo oscuro (100%), visiblemente sanos (NTP, 2007).

Los frutos sanos fueron separados de los picados, golpeados y fermentados; seguidamente se separó la fruta por su estado de maduración (verde, pintón y maduro); se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0,5% por espacio de diez minutos, luego del cual se enjuagó con agua tratada. Se separó el mesocarpio (pulpa) de la semilla y cáscara, esta actividad se realizó manualmente fruto por fruto con el fin de no mezclar otros componentes que posee el camu camu como son las antocianinas, entre otros.

Análisis bromatológicos

Se obtuvo humedad, proteínas, grasas y minerales de acuerdo a lo indicado por el Instituto Adolfo Lutz (1985). La concentración de carbohidratos se realizó

por diferencia de peso.

Preparación del extracto enzimático: ascorbasa

La enzima ascorbasa se obtuvo siguiendo la metodología de Cardello y Cardello (1998), que consiste en homogenizar las muestras de camu camu *in natura* durante tres minutos con tampón acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, conteniendo cloruro de sodio 150 mM. La relación pulpa-tampón fue de 1:20 y después de centrifugar a 12 000 x g por veinte minutos a 4 °C, el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

Determinación de la actividad ascorbasa

En un tubo de 5 ml se colocó 500 µL de ácido ascórbico 1 mM, 500 µL de fosfato dibásico de sodio 10 mM, pH 5,5 y 200 µL de extracto enzimático. Se incubaron las muestras a 30 °C en baño maría por cinco minutos. Se interrumpió la reacción adicionando 3 ml de HCl 0,2 N. Se agitó. Se leyó la absorbancia a 245 nm en el espectrofotómetro UV/vis. Se anotaron los resultados y se graficó la curva (Toyobo, 1984).

Cálculos según la fórmula 1:

$$\text{Volumen actividad (U/ml)} = \frac{(\text{OD blanco} - \text{OD ensayo}) \times V_t \times df}{10 \times 1 \times V_s} \quad (1)$$

Resumiendo:

$$\text{Volumen actividad (U/ml)} = \Delta\text{OD} \times 0,820 \text{ df}$$

$$\text{Medida de la actividad (U/mg)} = (\text{U/ml}) 1/C$$

Donde:

- ΔOD : $\Delta(\text{OD blanco} - \text{OD ensayo})$
- V_t : volumen total (4,1 ml)
- V_s : volumen de la muestra (0,1 ml)
- 10.0: coeficiente de extinción de ácido ascórbico sobre la condición del ensayo a pH 1 (F/micromol)
- 1.0: longitud de luz de la cubeta (cm)

- t: tiempo de reacción (5 minutos)
- df: factor de dilución
- C: concentración de enzima en dilución (c mg/ml)

Preparación del extracto enzimático: peroxidasa

Las muestras de camu camu *in natura* se homogenizaron durante tres minutos con agua destilada a 4 °C. La relación pulpa-agua fue de 1:20 y después de centrifugar a 12 000 x g por veinte minutos a 4 °C, el sobrenadante se usó como fuente de enzima (Avallone et al., 2000).

Determinación de la actividad de la peroxidasa

En un tubo de 5 ml se preparó la mezcla reaccional (mix*): 1,4 ml de agua destilada, 200 µL de tampón fosfato pH 6,0, 200 µL pirogalol, 100 µL de peróxido de hidrógeno. Se adicionó 100 µL de extracto enzimático al mix. Después de veinte segundos a 20 °C, se adicionó 100 µL de 2 N ácido sulfúrico para detener la reacción. Se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro UV/vis a 420 nm. Se anotaron los resultados y se graficó la curva.

Cálculos según la fórmula 2:

$$\text{Volumen actividad (U/ml)} = \frac{(\text{OD ensayo} - \text{OD blanco}) \times df}{0,117 V_s} \quad (2)$$

Resumiendo:

$$\text{Volumen actividad (U/ml)} = \Delta\text{OD} \times 8,547 \times df$$

$$\text{Medida de la actividad (U/mg)} = (\text{U/ml}) 1/C$$

Donde:

- ΔOD : $\Delta(\text{OD ensayo} - \text{OD blanco})$
- V_s : volumen de la muestra (1 ml)
- 0,117: densidad óptica a 420 nm correspondiente a 1 mg de purpurogalino en éter
- df: factor de dilución
- C: concentración de enzima en dilución (c mg/ml)

Análisis estadístico

La unidad experimental estuvo conformada por tres estados de maduración, dos temperaturas: 5 °C y -20 °C y tiempo de almacenamiento de quince días. Cada tratamiento fue repetido tres veces y los tratamientos se arreglaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3A x 2B x 6C; el factor A representa a tres estados de maduración (inmaduro, pintón maduro y maduro), el factor B representa temperaturas bajas de almacenamiento (5 °C y -20 °C) y C representa a días de almacenamiento (0, 3, 6, 9, 12 y 15 días). El factor A estuvo conformado por a1 = estado de maduración verde inmaduro, a2 = estado de maduración pintón maduro, a3 = estado de maduración maduro; el factor B conformado por b1 = 5 °C, b2 = -20 °C y el factor C conformado por c1 = 0 días, c2 = 3 días, c3 = 6 días, c4 = 9 días, c5 = 12 días, c6 = 15 días. Los promedios de las variables se analizaron mediante una regresión en la que

se evaluó la interacción lineal de los factores: estados de maduración, temperatura y tiempo de almacenamiento. Se examinó la parte factorial generada por las combinaciones de estados de maduración, temperatura y tiempo de almacenamiento, los cuales conforman superficies de respuesta (Zar, 1984).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se observa la evaluación de la actividad de la ascorbasa en pulpa de camu camu, en tres estados de maduración a estudio con almacenamiento a 5 °C. La actividad de la ascorbasa a 5 °C presentó incremento desde el inicio hasta el día 6, en días posteriores disminuyó su actividad hasta culminar la evaluación. La ascorbasa en pulpa de camu camu verde demostró un pico acentuado, la enzima después del inicio (0 días) aumentó su actividad hasta el día 6, luego en días posteriores declinó progresivamente hasta culminar el experimento.

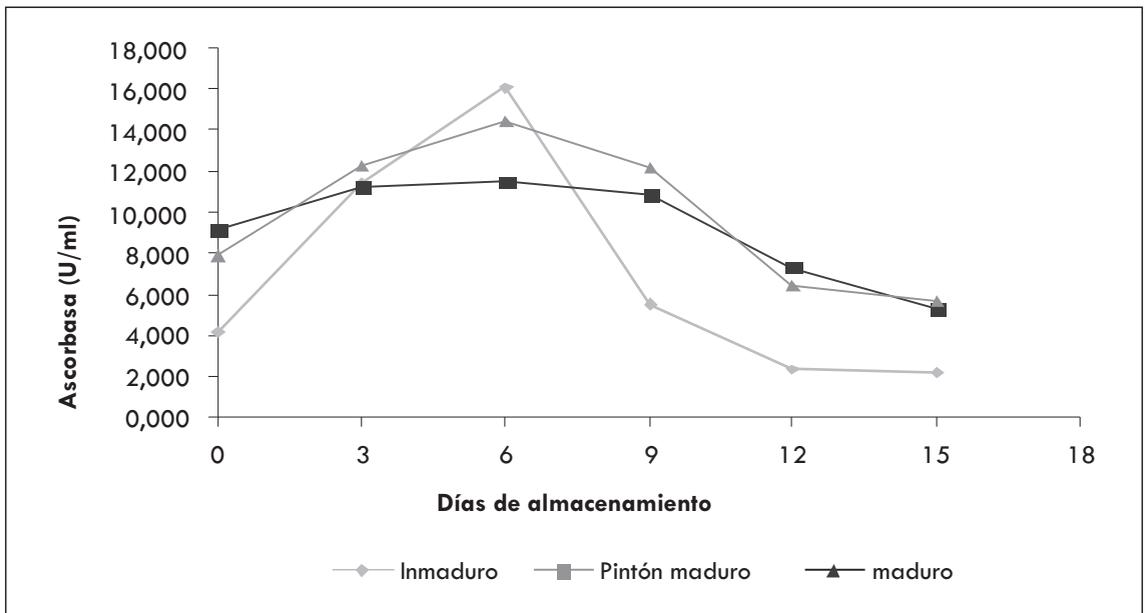


Figura 1. Actividad enzimática ascorbasa en pulpa de camu camu almacenada a 5 °C.

Smirnoff *et al.* (2001), Kato y Esaka (1999); Kisu *et al.* (1997), encontraron que la ascorbasa presenta probablemente este comportamiento debido a la importancia en el desarrollo y crecimiento del fruto. Entretanto la actividad de la ascorbasa en pulpa de camu camu pintón y maduro incrementó desde el inicio hasta el día 6, y conforme pasan los días va disminuyendo, posiblemente esto nos indica que la enzima durante la maduración del fruto disminuye su actividad hasta llegar a la senescencia. Cardello y Cardello (1998) comprobó el incremento de la ascorbasa durante la maduración del mango (*Mangifera indica* L.).

En la figura 2 se observa la evaluación

de la actividad de la ascorbasa en pulpa de camu camu, en tres estados de maduración a estudio con almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La actividad de la ascorbasa a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ demostró que en pulpa de camu camu verde aumenta durante los primeros días de evaluación, hasta llegar al día 9 desarrollando su máxima actividad. Conforme pasan los días va disminuyendo y aparentemente se observa una posible actividad constante hasta finalizar la evaluación. En pulpa de camu camu pintón y maduro, la ascorbasa aumenta progresivamente hasta el día 12 donde presenta su máxima actividad. En días posteriores es aparentemente constante hasta concluir la evaluación.

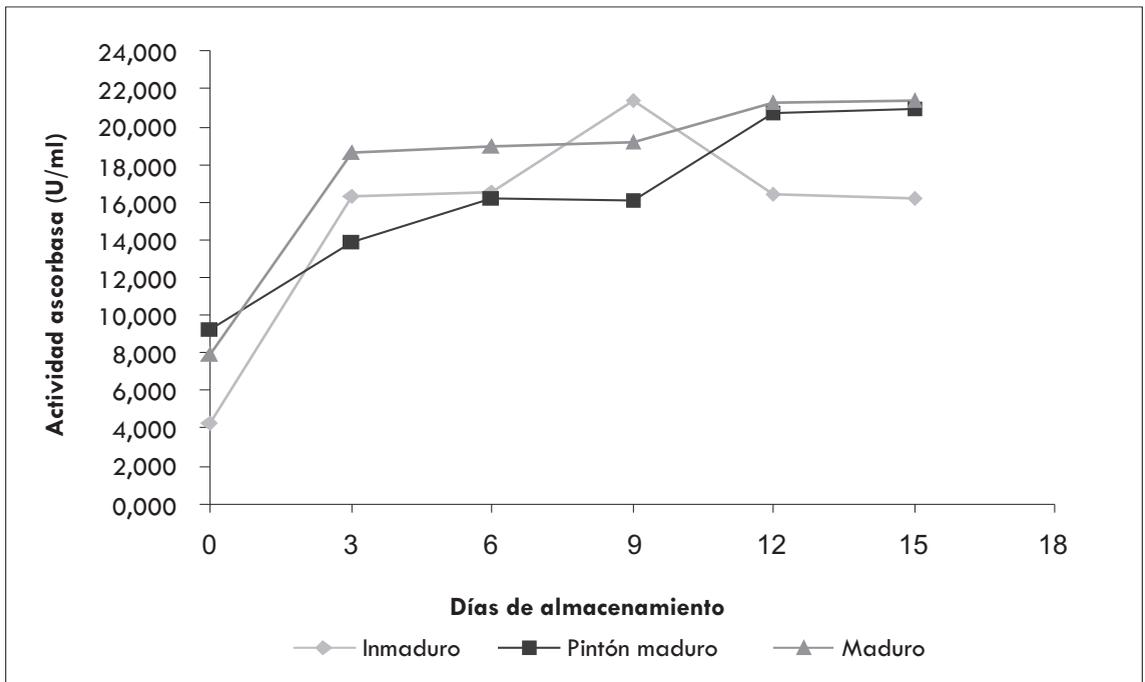


Figura 2. Actividad enzimática de la ascorbasa en pulpa de camu camu almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Badui (1999) menciona, que a bajas temperaturas el frío procesa las capas superiores hacia el interior de la pulpa; cuando la temperatura en el centro de la pulpa llega a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ existe el cambio de fase, donde las moléculas de agua no se encuentran disponibles para las reacciones

enzimáticas. Esto nos indica la actividad de la ascorbasa en pulpa almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; durante los primeros días de evaluación presenta actividad hasta llegar al día 9, donde probablemente las capas de frío en el centro de la pulpa llegaron al máximo, inhibiendo la actividad de la enzimática

hasta culminar el estudio.

En la figura 3 se muestra la evaluación de la actividad enzimática de la peroxidasa en los tres estados de maduración en estudio, de

la pulpa de camu camu almacenada a 5°C y se observa que esta enzima se incrementa notablemente, para los tres estados en el sexto día, declinando notablemente después de éste, para los días posteriores.

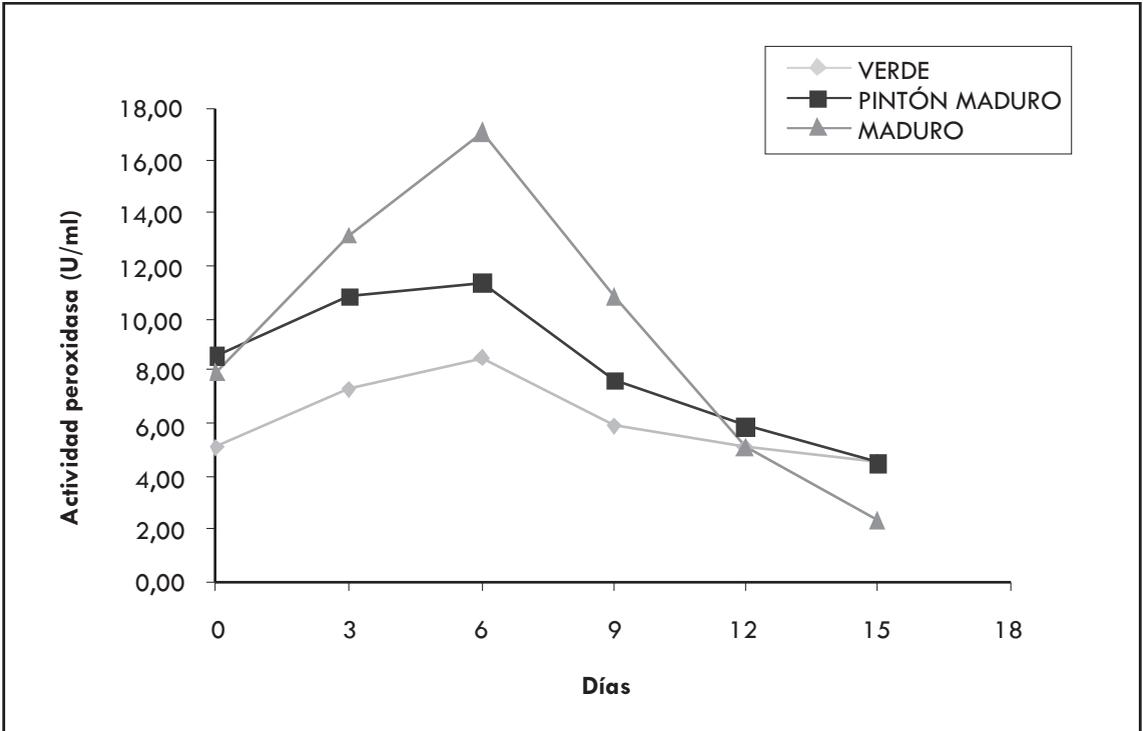


Figura 3. Actividad enzimática de la peroxidasa en pulpa de camu camu almacenada a 5°C.

Tejagal *et al.* (2005), observaron que durante el almacenamiento de zapote mamey a 5 °C y 10 °C la actividad de peroxidasa se mantuvo baja y sin cambio, esto es atribuible a una menor actividad por efecto del frío, aumentando rápidamente después de la transferencia a 20 °C.

En la figura 4 se evaluó la actividad de la peroxidasa en pulpa de camu camu en tres estados de maduración a estudio con almacenamiento a -20 °C. La actividad de la peroxidasa a -20 °C demostró que desde el tiempo inicial hasta el día 6 incrementó en los tres estados, después del día 9 disminuyó hasta culminar la evaluación, probablemente la actividad de peroxidasa

fue inhibida debido a las bajas temperaturas.

Pérez *et al.* (1999), observaron en frutos de zapote mamey con almacenamiento a 20 °C, que la actividad de la peroxidasa aumenta durante la maduración.

CONCLUSIONES

1. La ascorbasa demostró mayor actividad enzimática en pulpa en estado maduro almacenada a -20 °C. El día 15 de evaluación presentó una concentración de 21,381 U/ml. La pulpa verde almacenada a 5 °C en el día 6 de evaluación presentó una concentración de 16,121 U/ml, con diferencia

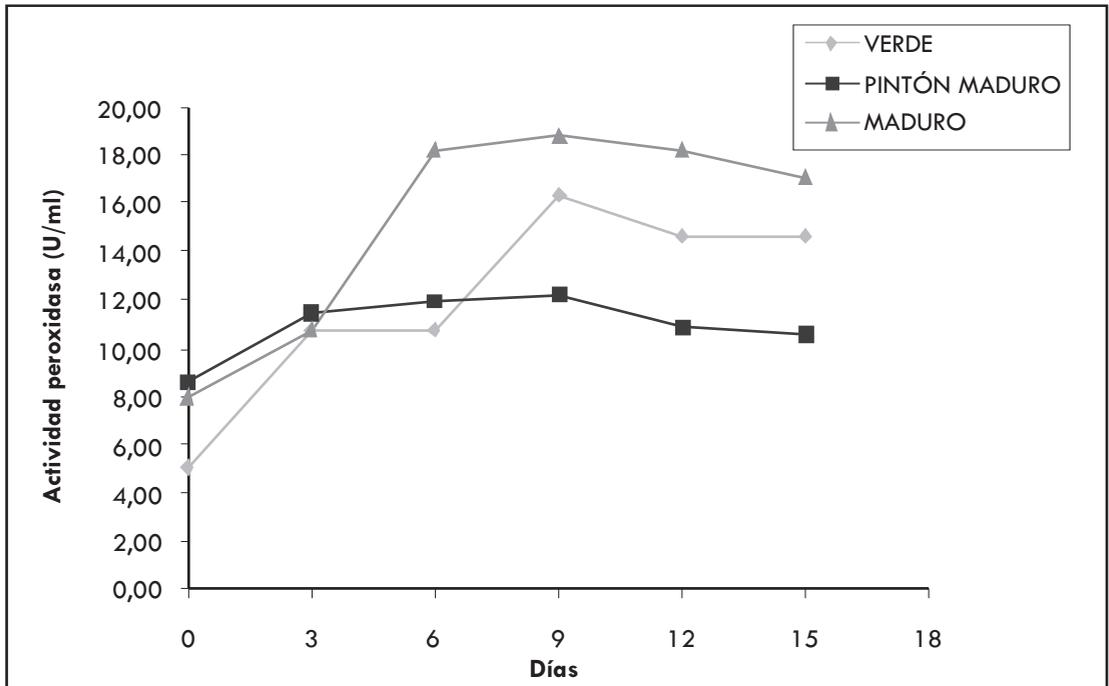


Figura 4. Actividad enzimática de la peroxidasa en pulpa de camu camu almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

significativa ($p < 0,05$).

- La peroxidasa demostró mayor actividad enzimática en estado maduro almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el día 9 de evaluación a una concentración de 19,373 U/ml. De igual modo la actividad de la peroxidasa almacenada a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ demostró al día 9 de evaluación una concentración de 17,826 U/ml, y estadísticamente no presentan diferencia significativa ($p < 0,05$).
- La ascorbasa y la peroxidasa en pulpa de *Myrciaria dubia*, camu camu, son factores de degradación del ácido ascórbico después de la cosecha del fruto. Dicha actividad está relacionada en forma independiente al estado de maduración del fruto.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Investigaciones de la

Amazonía Peruana por el financiamiento y oportunidad brindada para ejecutar el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade JS, Galeazzi MAM, Aragão CG, Chávez Flores WB. 1991. Valor nutricional do camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK McVaugh) cultivado em terra firme na Amazônia central. Revista Brasileira de Fruticultura, 13(2): 307-311.
- Avallone C, Cravzov A, Montenegro S, Pellizzari E. 2000. Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinesterasa y polifenoloxidasas en extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgaris* Schard). UNNE, Argentina.

Badui S. 1999. Química de los alimentos. 4ta. edición. Ed. Pearson-Addison. 648 pp.

- Cardello HM, Cardello L. 1998. Teor de vitamina C, Actividade de Ascorbato Oxidase e Perfil sensorial de Manga (*Mangifera indica* L.) Var. Haden, Durante o Almacenamento. Cienc. Tecnol. Aliment., v. 18, n.2, pp. 211-217. Maio/Julio.
- Cheftel JC, Cheftel H. 1983. Introducción a la bioquímica de alimentos. Zaragoza: Acribia. 2v.
- Instituto Adolfo Lutz. 1985. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2 ed. São Paulo. Vol 1. 583 pp.
- Kato N, Esaka M. 1999. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia Plantarum* v.105, 321-329.
- Kisu Y, Harada Y, Goto M, Esaka M. 1997. Cloning of the pumpkim ascorbate oxidase gene and análisis of a cis-acting region involved in induction by auxin. *Plant Cell Physiol. Kioto.* V. 38, n.5. Pp. 631-637.
- Norma Técnica Peruana, NTP 011.30. 2007. Productos naturales: camu camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh). Definiciones, clasificación y requisitos, 1ª edición.
- Pérez TGO, Vargas A, Díaz P, Téllez M. 1999. Actividad de polifenoloxidasa y peroxidasa en frutos de mamey y zapote (*Pouteria sapota*). *Rev. Iberoam. Teccnol. Postcosecha* 1: 120-125.
- Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu. Ver. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, Palo Alto, v. 52, pp. 437-467.
- Tejacal IA, Colinas LMT, Martínez DMT, Soto HRM. 2005. Daños por frio em Zapote Mamey (*Pouteria sapota* (JACQ) H.E. Moore and Stearn) II. Câmbios em fenoles totales y actividad enzimática, *Revista fitotecnia Mexicana, En- Mar*, Vol.28, N° 001, 25-32 pp.
- Toyobo Enzymes. 1984. Ascorbate oxidase assay. Japan: Toyobo, p. 1003. <http://www.toboyo.co.jp>; ASO-311.
- Zar VH. 1984. Bioestatistical analisis. 2ª ed. New Cork. Prentice may Inc. Englewood Cliffsp. Pp. 162-183.