

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

TITULO	ESTUDIO DEL FRUTO DEL BOROJO PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS DE INTERES EN LA INDUSTRIA COSMETOLOGICA Y ALIMENTICIA: "Efecto de extractos fenólicos de Borojó (Borojoa patinoi cuatrec) en dos estados de maduración sobre la actividad in vitro de la enzima Hialuronidasa."
---------------	---

SUBTITULO	
------------------	--

AUTOR(ES) Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Javier Alexander Jiménez
---	---------------------------------

PALABRAS CLAVE (Mínimo 3 y máximo 6)	Polifenoles	Hialuronidasa
	Pardeamiento	Inhibición
	Polifenoloxidasa	Borojó.

RESUMEN DEL CONTENIDO (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>En este estudio se hizo una caracterización preliminar de la polifenoloxidasa del Borojó en dos estados de maduración, se visualizaron las cinéticas de pardeamiento, obteniendo los valores cinéticos para el extracto crudo, además se ensayo la inhibición de la hialuronidasa utilizando como inhibidores extractos polifenólicos obtenidos de los frutos de Borojó, obteniendo mayor inhibición por parte de los extractos derivados del Borojó en estado verde en las diferentes concentraciones utilizadas.</p> <p>Se evidenció una mayor actividad de la polifenoloxidasa y capacidad inhibitoria de la hialuronidasa en Borojó en estado verde, indicando la necesidad de estudiar el fruto durante el proceso de senescencia, con el fin de conservar los polifenoles presentes de gran interés en la industria por sus múltiples funciones.</p>
---	---

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.



**ESTUDIO DEL FRUTO DEL BOROJO PARA LA OBTENCION DE
COMPUESTOS DE INTERES EN LA INDUSTRIA COSMETOLOGICA Y
ALIMENTICIA: “Efecto de extractos fenólicos de Borojó (*Borojoa patinoi*
cuatrec) en dos estados de maduración sobre la actividad *in vitro* de la
enzima Hialuronidasa.”**

Javier Alexander Jiménez Forero*

Trabajo de Tesis para optar por el grado de Magister en Diseño y gestión de
procesos.

DIRECTORES

Luis Eduardo Díaz, Ph.D.¹

Luz Indira Sotelo Díaz, Ph.D.²

**Universidad de La sabana
Facultad de Ingeniería
Maestría en Diseño y Gestión de Procesos
Bogotá, D.C
Agosto del 2012**

¹Doctorado en Química. Grupo de Procesos Agroindustriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, campus universitario puente del común, Km 21, Chía, Cundinamarca, Colombia.

²Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Grupo de Procesos Agroindustriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, campus universitario puente del común, Km 21, Chía, Cundinamarca, Colombia.

**ESTUDIO DEL FRUTO DEL BOROJO PARA LA OBTENCION DE
COMPUESTOS DE INTERES EN LA INDUSTRIA COSMETOLOGICA Y
ALIMENTICIA: “Efecto de extractos fenólicos de Borojó (*Borojoa patinoi*
cuatrec) en dos estados de maduración sobre la actividad *in vitro* de la
enzima Hialuronidasa.”**

PhD. Carmenza Duque

EVALUADOR 1

PhD. María Ximena Quintanilla

EVALUADOR 2

PhD. Luis Eduardo Díaz

DIRECTOR 1

PhD. Luz Indira Sotelo Díaz

DIRECTOR 2

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi Padre que lo acompaña y me brindan la voluntad y fuerza para continuar ante los diferentes tropiezos que impensadamente se presentan.

A mi Naty, Alfredito, Jairito, Johnso y amigos, por su apoyo incondicional.

A mis Directores Indira y Luis Eduardo por su amistad, dedicación, consejos y enseñanzas durante todo el proceso.

Al grupo de profesores que durante estos años de estudio me han brindado las herramientas y conocimientos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

A los auxiliares de laboratorio Jorgito, Pili, Marthica, Carito y Toño que además de siempre estar prestos a colaborar, brindan desde sus experiencias consejos que ayudaron bastante en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de maestría que con su apoyo y alegría hicieron de este proceso una experiencia memorable.

A la Facultad de Ingeniería, por facilitarme los equipos y materiales necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Al Fondo Patrimonial Especial de la Universidad de La Sabana por su apoyo financiero en el proyecto ING-89-2010.

A todos y cada uno de ustedes mi más sincero agradecimiento, sin ustedes esto no habría sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. CAPITULO I: ASPECTOS GENERALES.....	1
1.1 INTRODUCCION	1
1.2 OBJETIVOS	4
1.2.1 <i>Objetivo General</i>	4
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	4
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	4
1.4 HIPOTESIS	5
1.5 ALCANCE.....	5
2. CAPITULO II: POTENCIAL DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS EN MATRICES ALIMENTARIAS DE ORIGEN NATURAL.....	6
2.1 RESUMEN	6
2.3 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA.....	7
2.4 BIOSÍNTESIS Y PROPIEDADES FITOLÓGICAS.....	10
2.4 FUENTES DE POLIFENOLES DE ORIGEN TROPICAL.....	12
2.5 USOS POTENCIALES EN LA INDUSTRIA.....	15
2.6 CONCLUSIONES.....	16
3. CAPITULO III: EXTRACCIÓN, CINÉTICA Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA DEL BOROJÓ.....	17
3.1 RESUMEN	17
3.2 INTRODUCCION.....	18
3.3 MATERIALES Y METODOS	19

3.3.1	<i>Material Vegetal</i>	19
3.3.3	<i>Análisis Morfo estructural Del Fruto</i>	20
3.3.4	<i>Determinación del índice de madurez.</i>	20
3.3.5	<i>Obtención de extractos enzimáticos.</i>	21
3.3.6	<i>Cuantificación de polifenoles.</i>	22
3.3.7	<i>Cuantificación de proteínas.</i>	22
3.3.8	<i>Ensayo De La Actividad Polifenoloxidasa (PFO)</i>	23
3.3.9	<i>Evaluación De Propiedades Enzimáticas</i>	23
3.3.9.1	<i>Efecto del pH en la actividad PFO</i>	23
3.3.9.2	<i>Efecto de la Temperatura en la actividad PFO</i>	24
3.3.9.3	<i>Especificidad con el sustrato y cinética enzimática</i>	24
3.3.10	<i>Evaluación preliminar de los perfiles proteicos por electroforesis SDS-PAGE.</i>	24
3.3.11	<i>Análisis Estadístico</i>	25
3.4	RESULTADOS Y DISCUSION	25
3.4.1	<i>Análisis Morfo estructural Del Fruto</i>	25
3.4.2	<i>Índice De Madurez</i>	26
3.4.3	<i>Cuantificación de Polifenoles.</i>	27
3.4.4	<i>Cuantificación De Proteínas</i>	28
3.4.5	<i>Ensayo De La Actividad Polifenoloxidasa (PFO)</i>	29
3.4.6	<i>Evaluación de propiedades enzimáticas.</i>	30
3.4.6.1	<i>Efecto del pH en la actividad PFO</i>	30
3.4.6.2	<i>Efecto de la Temperatura en la actividad PFO</i>	32
3.4.6.3	<i>Especificidad con el sustrato y cinética enzimática</i>	34

3.4.6.4 Evaluación Preliminar De Los Perfiles Proteicos Por Electroforesis SDS-PAGE

39

3.5 CONCLUSIONES	39
4. CAPITULO IV: ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA HIALURONIDASA A PARTIR DE EXTRACTOS DE BOROJO	41
4.1 RESUMEN	41
4.2 INTRODUCCION	41
4.3 MATERIALES Y METODOS	43
4.3.1 <i>Material Vegetal</i>	43
4.3.2 <i>Reactivos Químicos</i>	43
4.3.3 <i>Obtención de extractos polifenólicos.</i>	44
4.3.4 <i>Cuantificación de polifenoles.</i>	44
4.3.5 <i>Ensayo De La Actividad Hialuronidasa.</i>	45
4.3.6 <i>Análisis Estadístico.</i>	46
4.4 RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
4.4.1 <i>Cuantificación de Polifenoles</i>	46
4.4.2 <i>Ensayo de la actividad Hialuronidasa</i>	47
4.5 CONCLUSIONES	52
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	65

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Boroj3 en estado incompleto de maduraci3n, (Fuente: Autor).....	2
Figura 2. Boroj3 en estado completo de maduraci3n, (Fuente: Autor).	2
Figura 3. Estructura b3sica de flavonoides (35).....	8
Figura 4. Subclases de los flavonoides (34).	9
Figura 5. Bios3ntesis de compuestos fen3licos a partir de la ruta del 3cido siqu3mico (43).	10
Figura 6. Posibles rutas de bios3ntesis de 3cido g3lico. (45)	11
Figura 7. Procesos de hidroxilaci3n y oxidaci3n de las PFO's (75).....	19
Figura 8. Fases obtenidas en el Boroj3 Maduro despu3s de la centrifugaci3n. (Fuente: Universidad de La Sabana (2011))	22
Figura 9. Microscopia 3ptica del fruto del Boroj3 Maduro.	26
Figura 10. Microscopia 3ptica del fruto del Boroj3 Verde.....	26
Figura 11. Cuantificaci3n de polifenoles totales para cada uno de los extractos.	28
Figura 12. Cuantificaci3n de prote3nas para cada uno de los extractos.	29
Figura 13. Cambio en la actividad PFO de los extractos enzim3ticos en el tiempo.	30
Figura 14. Efecto del pH en la actividad PFO	30
Figura 15. Grafica de componentes principales para el efecto del pH.	31
Figura 16. Efecto de la Temperatura en la actividad PFO.....	33
Figura 17. Gr3fica de componentes principales para el efecto de la Temperatura.....	33
Figura 18. Efecto de la concentraci3n de sustrato en la actividad PFO.....	35
Figura 19. Grafica de componentes principales para el efecto de la Concentraci3n de sustrato. ...	35
Figura 20. Determinaci3n de K_m y V_{max} para la PFO presente en extractos de Boroj3 Maduro. .	37
Figura 21. Determinaci3n de K_m y V_{max} para la PFO presente en extractos de Boroj3 Verde. ...	37
Figura 22. Determinaci3n de K_m y V_{max} para la PFO presente en extractos Gel de Boroj3 Maduro.	38
Figura 23. Electroforegrama para cada una de las fases de extracci3n.	39
Figura 24. Estructura del 3cido Hialur3nico (100).	42

Figura 25. Cuantificación de fenoles totales en los extractos etanólicos.	47
Figura 26. Inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando extractos etanólicos de Borojé.....	49
Figura 27. Comparativo de Inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando extractos etanólicos de Borojé Verde y ácido gálico.....	50
Figura 28. Comparativo de Inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando extractos etanólicos de Borojé Maduro y ácido gálico.....	51
Figura 29. Gráfica de efectos principales en el porcentaje de inhibición de la enzima Hialuronidasa.....	52
Figura 30. Gráfica de calibración estándar de ácido gálico.	65
Figura 31. Gráfica de calibración estándar de albumina de suero bovino (BSA).	65
Figura 32. Barrido espectral de soluciones de catecol 1M y 100 mM.	66

LISTADO DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en algunos frutos tropicales	12
Tabla 2. Índice de madurez para el Borojó verde y maduro.....	27
Tabla 3. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto del pH y grado de maduración en la actividad PFO (ANEXO 5).	32
Tabla 4. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto de la temperatura y el grado de maduración en la actividad PFO (ANEXO 7).	34
Tabla 5. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto de la concentración de sustrato y grado de maduración en la actividad PFO (ANEXO 8).	36
Tabla 6. Constantes cinéticas obtenidas para las preparaciones de extracto enzimático PFO de frutos de Borojó en dos estados de maduración.	38
Tabla 7. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto de la concentración de sustrato y grado de maduración. en la inhibición de la enzima Hialuronidasa (ANEXO 10).....	48

LISTADO DE ECUACIONES

	Pág
Porcentaje de Acidez (Ec. 1).	21
Definición de unidad enzimática para la actividad PFO (Ec. 2).	23
Calculo del % de inhibición de la actividad hialuronidasa por los extractos polifenólicos. (Ec. 3)...	46

LISTADO DE ANEXOS

	Pág
ANEXO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO.	65
ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ALBUMINA DE SUERO BOVINO (BSA).	65
ANEXO 3. BARRIDO ESPECTRAL DE SOLUCIONES DE CATECOL A DOS CONCENTRACIONES.....	66
ANEXO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN EXTRACTOS.	66
ANEXO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONTENIDO PROTEICO EN LOS DIFERENTES EXTRACTOS.	67
ANEXO 6. ANALISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DEL pH Y GRADO DE MADURACIÓN EN LA ACTIVIDAD PFO.	68
ANEXO 7. ANALISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y GRADO DE MADURACIÓN EN LA ACTIVIDAD PFO.	82
ANEXO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y GRADO DE MADURACIÓN EN LA ACTIVIDAD PFO.	92
ANEXO 9. ANÁLISIS DE VARIANZAS PARA EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS ETANOLICOS SECADOS POR ROTOEVAPORACION.	109
ANEXO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO Y SOLUCIONES DE ACIDO GALICO EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HIALURONIDASA.....	110
ANEXO 11. TRABAJOS PRESENTADOS.....	126

ABREVIACIONES

A continuación se presenta una lista con las abreviaturas que aparecen de manera frecuente durante la redacción de este trabajo. Los caracteres entre paréntesis se utilizan para indicar la formación del plural del término.

PFO:	Polifenoloxidasas.
EAM:	Extracto acuoso de Borojé Maduro.
EGM:	Extracto Gel de Borojé Maduro.
EAV:	Extracto acuoso de Borojé Verde.
EEVR:	Extracto etanólico de Borojé Verde concentrado.
EEMR:	Extracto etanólico de Borojé Maduro concentrado.
AGV:	Solución de ácido gálico a una concentración promedio al contenido de polifenoles totales en EEVR.
AGM:	Solución de ácido gálico a una concentración promedio al contenido de polifenoles totales en EEMR.

1. CAPITULO I: ASPECTOS GENERALES

1.1 INTRODUCCION

El Borojón es un fruto propio de la región pacífica de Colombia, región con críticas necesidades económicas, sociales y tecnológicas, en donde los índices de necesidades básicas satisfechas (NBS) y de calidad de vida (ICV) obtenidos para esta región han sido una preocupación constante durante varias décadas (1), remarcando la necesidad de dar mayor valor a los productos autóctonos de la región.

El Borojón (*Borojoa patinoi*) es una especie arbórea de 3 a 5 m de altura de tallo erecto, leñoso y hojas decusadas, de clima tropical y subtropical, perteneciente a la familia Rubiácea (2). Existen dos especies: *Borojoa patinoi* Cuatrecasas y *Borojoa sorbilis* Cuatrecasas, originarias del sotobosque selvático del interior del departamento del Chocó, selvas amazónicas, Ecuador, Brasil, Panamá y la costa pacífica Colombiana (3). El fruto de este árbol es una baya carnosa no climatérica de 7 a 12 cm de largo y diámetro, que en sus primeros estados es verde clara de pulpa blanca (Figura 1) y al madurar se torna parda rojiza (Figura 2). La pulpa está constituida por el mesocarpio y el endocarpio, sin separación aparente con la cáscara, el 88% corresponde a la pulpa ya que este posee un promedio de 730 semillas por fruto; el mesocarpio es carnoso con sabor aromático y muy perfumado (4). A pesar que la literatura científica reportada de este fruto es muy escasa, el saber popular le ha atribuido propiedades medicinales y terapéuticas ya que tradicionalmente los nativos han empleado este fruto como cicatrizante y como medio para embalsamar cadáveres, además se le han atribuido propiedades como energizante en la actividad sexual (5) (6).

Pocos estudios se han desarrollado en torno al Borojón, y ninguno específicamente en cuanto a su actividad enzimática polifenoloxidasas, sin embargo se han desarrollado estudios en donde se indujo la producción de una fitoalexina a partir

de Borojón y en donde se logró establecer en gran medida la estructura de la misma (7).

Por otro lado, en el 2004, es estudios dirigidos por el Instituto A. Von Humboldt se plasmó una guía ilustrada de géneros *rubiácea* de Colombia, con el fin de mostrar la gran diversidad de esta familia de plantas presentes en el territorio colombiano entre los que se encuentra el Borojón (3). Además, debido a que el Borojón es una planta dioica, se realizó una investigación acerca del diagnóstico del sexo de las plantas vía reacción en cadena de la polimerasa, en donde se analizaron plantas con sexo molecularmente identificado por PCR, encontrándose resultados congruentes entre éstas y los marcadores moleculares utilizados (4). Por otro lado, con el fin de mejorar el consumo de este fruto, se han elaborado bebidas tipo infusión (8) y cremo lácteas (9) a base del mismo, obteniendo propiedades organolépticas y nutricionales de gran aceptación.



Figura 1. Borojón en estado incompleto de maduración, (Fuente: Autor)



Figura 2. Borojón en estado completo de maduración, (Fuente: Autor).

Mosquera y colaboradores (10) han estudiado algunas características sobre las propiedades funcionales de la pulpa obtenida mediante el secado por aspersion, quienes también han evaluado el efecto de la Maltodextrina en la estabilidad de la pulpa de Borojón secada por liofilización (6).

En estudios previos realizados por el grupo de procesos agroindustriales de la Universidad de La Sabana, se demostró la presencia de metabolitos secundarios en pulpa de Borojón (fenoles, flavonoides y triterpenos), a los cuales se les ha evaluado el potencial antioxidante (2), y que a su vez han sido reportados como sustancias activas biológicamente con múltiples funciones, entre ellas la inhibición de la enzima hialuronidasa (11) (12) (13) (14); además, se han logrado resultados favorables acerca de la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles en extractos acuosos e infusiones obtenidas a partir de pulpa de Borojón, y como se relacionan éstos con actividades antimicrobianas de patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (2) (15).

Los resultados obtenidos en estudios previos y reportados por otros autores indican que la pulpa de Borojón posee compuestos y características significativas para el diseño de productos de carácter funcional. Incluso se puede llegar a inferir que este fruto puede ser utilizado en la obtención de agentes antioxidantes y antimicrobianos, para ser utilizados en el sector agroindustrial en reemplazo de antioxidantes sintéticos para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, actuando como preservante natural (15) (2) (9).

Por estos motivos el presente trabajo el cual se encuentra contenido en cuatro capítulos, pretende hacer una caracterización de la enzima polifenoloxidasas presente en el Borojón y determinar el uso potencial de los polifenoles presentes en la pulpa de este fruto para la inhibición de la enzima hialuronidasa a nivel *in vitro* con el fin de obtener agentes naturales útiles en la industria alimenticia y cosmetológica (16) (17), además se pretende dar respaldo a algunas de las características atribuidas por el saber popular sobre las bondades y propiedades de este fruto, que den la posibilidad de acceso a nuevos mercados y a considerar el fruto como un bien exportable y altamente comerciable (18) (19), incentivando al cultivo de este producto regional, como alternativa a la inserción de productos foráneos, los cuales no se encuentran adaptados al medio en el cual se cultivan, lo que estimula al consumo de pesticidas y herbicidas para su producción (18) (19).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la importancia de la(s) enzima(s) polifenoloxidasas presentes en diferentes extractos de Borojón (*Borojoa patinoi cuatrec*), y su relación con el potencial inhibitorio de la actividad enzimática hialuronidasa debido a los compuestos fenólicos presentes en este fruto.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad y presencia de la enzima PFO por medio de técnicas espectrofotométricas y/o electroforéticas.
- Determinar el potencial inhibitorio de la actividad hialuronidasa utilizando como agente inhibidor los extractos de Borojón.
- Evaluar la relación entre la actividad PFO con la actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa por medio de sus comportamientos cinéticos.

1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

El poco estudio llevado a cabo sobre el Borojón y las propiedades que se le atribuyen a este han llevado a plantear el siguiente cuestionamiento: ¿Qué importancia tiene la polifenoloxidasa en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en el Borojón, de tal manera que sea posible la utilización de los mismos en la inhibición de enzimas de interés industrial como la hialuronidasa?

Determinar y caracterizar la actividad de la enzima PFO, ha sido de gran interés por su presencia en gran cantidad de productos agroindustriales, en donde es una de las principales causas de deterioro de los mismos; este trabajo tiene como objetivo dar mayor conocimiento de esta enzima en el Borojón, además de abrir espacio a nuevas investigaciones sobre las propiedades del mismo como el comportamiento e inhibición de la misma a diferentes condiciones, generando posibles alternativas en el control de la degradación de compuestos fenólicos presentes en el fruto, de los cuales se han reportado valores entre 600 y 800 mg ácido gálico/100 gr de fruto (2), y de los cuales se han reportado actividades

de inhibición de otros compuestos como la enzima hialuronidasa, la cual es de gran interés principalmente en las industrias cosmetológica y farmacéutica, estudios anteriores han evidenciado actividad inhibitoria de esta enzima debido al contenido de fenoles presentes. (20) (21) (22).

Por otro lado, este proyecto pretende dar continuidad a los estudios que se vienen realizando en la Universidad de La Sabana, financiados mediante convocatoria interna en los proyectos ING-34-2007 e ING-89-2009.

1.4 HIPOTESIS

El uso de compuestos polifenólicos como agentes antioxidantes y su interacción en otro tipo de reacciones bioquímicas han puesto de manifiesto gran interés en la comunidad científica; Estudios previos han demostrado el potencial del fruto del Borojón maduro como fuente importante de polifenoles, sin embargo el fruto en estado post-cosecha es de color marrón, en el cual el cambio de color se presenta durante la maduración, relacionada a enzima(s) polifenol oxidasa(s), por lo cual en esta investigación se pretende comprender la actividad de las enzimas polifenoloxidasas en el Borojón (*Borojoa Patinoi Cuatrec*) en dos estados de maduración, de tal manera que sea posible la utilización de extractos polifenólicos en reacciones de interés industrial como es la inhibición de la enzima hialuronidasa.

1.5 ALCANCE

Se buscará obtener y analizar la fracción electroforética con el fin de determinar el peso molecular de la enzima polifenoloxidasa. La determinación de la actividad polifenoloxidasa y actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa se harán en laboratorio utilizando extractos del Borojón (*Borojoa Patinoi Cuatrec*) en dos estados de maduración. Se analizará la velocidad, efecto del pH y efecto de la temperatura de la reacción de degradación de catecol utilizando los extractos a estudiar (actividad PFO) y la hidrolización de Hialuronato de Sodio utilizando como inhibidores los extractos a estudiar (actividad inhibitoria de la hialuronidasa).

2. CAPITULO II: POTENCIAL DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS EN MATRICES ALIMENTARIAS DE ORIGEN NATURAL

2.1 RESUMEN

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en productos de origen vegetal, a los cuales se les ha atribuido diferentes propiedades biológicas dentro del metabolismo en plantas y animales; en los últimos años estos compuestos han adquirido gran relevancia en el desarrollo de productos para diferentes tipos de industria por su variada capacidad de interacción con diferentes macromoléculas que juegan papeles importantes en el metabolismo humano; considerando la importancia de los países tropicales como productores de frutas exóticas y el potencial de estas como fuente de ingredientes naturales bioactivos, en este trabajo se hace una revisión general en los compuestos fenólicos encontrados en diferentes productos de origen tropical, su clasificación, propiedades, funciones dentro de la matriz biológica a la que pertenecen y el posible uso de estos compuestos en diferentes industrias, con el fin de incentivar la producción e investigación en el desarrollo de nuevos tipos de productos con carácter antioxidante de origen natural.

Palabras clave: polifenoles, macromoleculas, ingredientes naturales.

2.2 INTRODUCCION

El incremento en enfermedades degenerativas, causadas primordialmente por la presencia de radicales libres derivados básicamente de fuentes endógenas (metabolismo de nutrientes y procesos de envejecimiento), la ingesta de algún contaminante y de fuentes exógenas (agentes químicos, contaminación del aire, radiación) (23) son denominadas como especies oxígeno reactivas (ROS) y son asociadas a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos (24) (25) y al natural envejecimiento humano. Entre los problemas que originan se resalta la destrucción de paredes celulares en tejidos animales, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico y

daño del material genético (26). Estas especies con oxígenos activos incluyen el radical super óxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^-) y el radical óxido nítrico (NO^*), por estas razones se ha tenido gran interés en la investigación y desarrollo de compuestos naturales que disminuyan la oxidación causada por estos radicales libres en el organismo denominados antioxidantes (27).

La interacción de macromoléculas con estos compuestos poli fenólicos de bajo peso molecular, entre ellos flavonoides, puede modificar sus propiedades químico-físicas, disminuyendo o anulando totalmente su capacidad de reaccionar. Diferentes trabajos han confirmado la capacidad de los compuestos fenólicos en modular algunas enzimas, tales como: hidrolasas, transferasas, kinasas, oxidasas, hidroxilasas, glutatión S-transferasa, óxido nítrico sintasa, sistemas citocromo P450, ATPasas, lipasas, fosfolipasas, adenilatociclasas, RNA y DNA polimerasas, DNA ligasa I humana, ribonucleasa, transcriptasa reversa, topoisomerasa, aromatasas, hialuronidasa, elastasa, proteinasa e integrasa de HIV-1, aldosa reductasa (28) (29).

En general, estas actividades pueden explicar la correlación entre polifenoles y sus efectos anti-cancerígeno (16), anti-trombotico, anti-aterogenético (30), anti-diabético (31) y anti-inflamatorios (30) (32); esto ha conducido a que los compuestos fenólicos adquieran un espacio importante en este tipo de investigación por su carácter multi-activo.

2.3 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

Los polifenoles han sido clasificados ácidos fenólicos, flavonoides y taninos de acuerdo a su estructura y al número de anillos fenólicos que contiene la misma (33).

Los ácidos fenólicos poseen en su estructura química el anillo aromático, el grupo hidroxílico y una función carboxílico (25).

Los flavonoides, son compuestos de bajo peso molecular que pueden encontrarse desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos altamente polimerizados con

pesos moleculares mayores de 30000 Da (34), más de 6000 han sido identificados (35), y comparten un esqueleto común de di-fenilpiranos (C6-C3-C6; compuestos principalmente por dos anillos fenólicos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) como se puede ver en la Figura 3 (36).

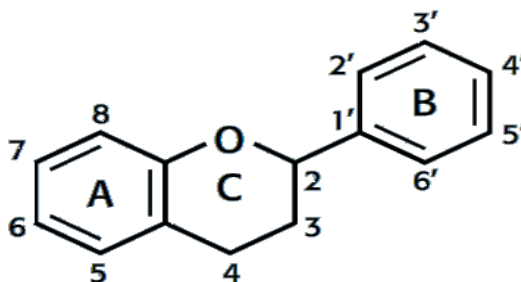


Figura 3. Estructura básica de flavonoides (35).

Los flavonoides han sido categorizados en 13 subclases (Figura 4) (37) (34), sin embargo, de acuerdo a sus cambios estructurales los flavonoides también se han clasificado en flavanos, flavonoles, flavonas, leucoantocinidinas, catequinas, isoflavonoides y antocianidinas; los flavanos, flavonoles, leucoantocinidinas, catequinas y antocianidas tienen un grupo -OH en posición 3 del anillo C (3 - hidroxil flavonoides); sin embargo, además del grupo -OH, los flavonoles poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo, mientras que las antocianidas poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C; las antocianidas y catequinas carecen del grupo carbonilo en el carbono 4 (35).

Mientras que, las flavonas poseen un grupo carbonilo en el carbono 4 y carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo C. (25).

Los isoflavonoides difieren de estos grupos, en la unión del anillo B con el C, la cual se hace por el carbono 3 en lugar del carbono 2 (36).

Los Taninos, son compuestos polifenólicos básicamente clasificados en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables son poliésteres de la glucosa y se clasifican en función del ácido formado a partir de la hidrólisis, en taninos gálicos o elágicos (38); mientras que los taninos condensados son polímeros de catequina o proantocianidinas (39). Dado que

estos taninos están compuestos por monómeros tipo catequina han sido también incluidos dentro de los flavonoides (40).

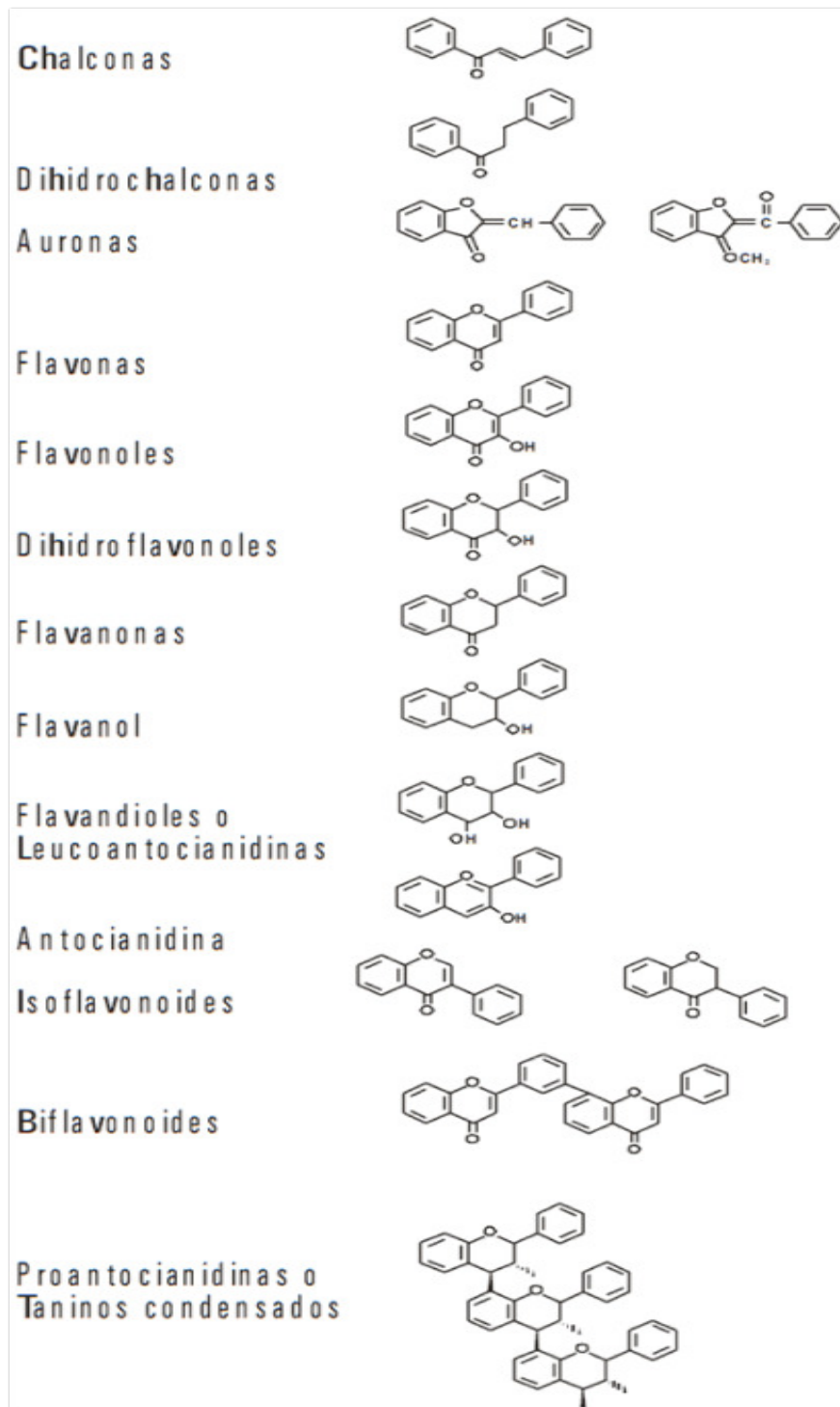


Figura 4. Subclases de los flavonoides (34).

2.4 BIOSÍNTESIS Y PROPIEDADES FITOLÓGICAS

Los compuestos fenólicos de origen natural se encuentran principalmente en cereales, frutas y vegetales (41), estos son metabolitos secundarios biosintetizados por las plantas mediante complejas rutas metabólicas de origen mixto en las que se ven involucradas reacciones enzimáticas como hidroxilaciones, metilaciones, acetilaciones y glicosilaciones (42).

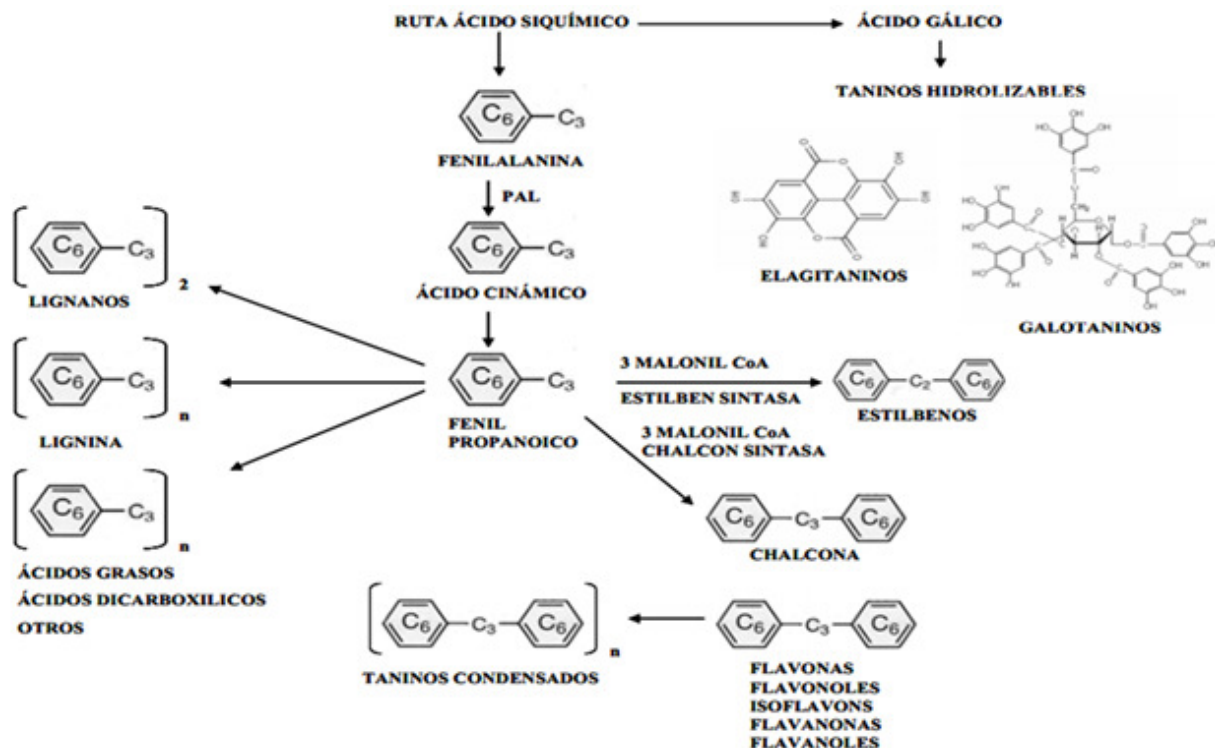


Figura 5. Biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la ruta del ácido siquímico (43).

De la ruta del ácido siquímico se derivan compuestos fenólicos sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, y derivados del fenilpropano. Por otro lado, de la ruta de los poliacetatos se derivan quinonas y floriglucinoles, mientras que los flavonoides se originan por medio de la combinación de estas dos rutas (Figura 5) (41).

A partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina se da lugar al ácido cinámico y al ácido p - hidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides (Figura 3). Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados (36).

Los Taninos de relativamente alto peso molecular se dividen en condensados e hidrolizables, y son solubles en soluciones polares, dando a veces disoluciones coloidales en agua; son solubles también en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares (38) (44) (43).

Debido a que los taninos hidrolizables están basados estructuralmente en unidades de ácido gálico, primero es necesario entender la síntesis de éste, se han propuesto dos posibles rutas de síntesis (Figura 6), en la ruta (a) hay una deshidrogenación directa de un intermediario en la vía del ácido siquímico y la retención de los átomos de oxígeno del precursor alicíclico sin embargo generalmente los compuestos fenólicos son derivados de los productos finales de la ruta por inserción de oxígeno en el núcleo aromático (b) (45).

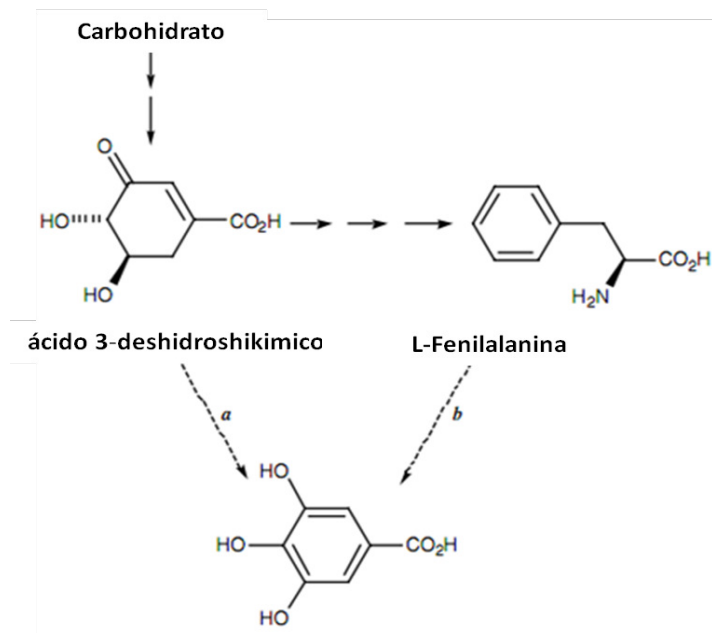


Figura 6. Posibles rutas de biosíntesis de ácido gálico. (45)

Los compuestos fenólicos son determinantes en la calidad sensorial y nutricional de las frutas y vegetales (46) y son investigados actualmente por atribuírseles una variada actividad farmacológica (33), en general asociada a la capacidad de actuar como agentes antioxidantes, secuestradores de radicales libres, actividad antimicrobiana y antiviral (26).

Esta capacidad antioxidante de los polifenoles es parte del mecanismo de defensa de las plantas, los cuales son producidos bajo condiciones de estrés, tales como alteraciones de temperatura, exposición ultra violeta y ataques patógenos (47).

2.4 FUENTES DE POLIFENOLES DE ORIGEN TROPICAL

El contenido de fenoles varía de acuerdo a la especie, a su grado de maduración, tamaño, textura del fruto, condiciones de almacenamiento y cultivo, entre otros, y se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas (41) (23) (48). En la Tabla 1, se pueden observar algunos estudios en frutos de origen tropical relacionados con el contenido de fenoles totales y su capacidad antioxidante, además de los estudios realizados por Fu L. y colaboradores en 62 frutas, y los realizados por Contreras y colaboradores en diferentes frutas exóticas Colombianas (49), demostraron que las frutas tienen diferente capacidad antioxidante, y que ésta depende del contenido total de fenoles en la misma (48), además se han encontrado diferentes cantidades de fenoles totales en frutos de la misma especie, lo que indica una fuerte incidencia del contenido de fenoles y capacidad antioxidante desde las etapas de cultivo.

Tabla 1. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en algunos frutos tropicales

FRUTA	Capacidad Antioxidante	Contenido de polifenoles totales (mg eq-ácido gálico/100g)	Fuente
Banana (<i>Musa paradisiaca</i> L)		72.2 ± 2.03	Alothman, Bhat, & Karim, 2009. (50).
		28.13 ± 0.77	Ayub Ali, Inaotombi Devi, Nayan, Chanu, & Ralte, 2010. (51).
Banana (<i>Passiflora tarminiana</i>)	175 ± 4.18 (µg Trolox/ 100g)	1018 ± 14.5	(Contreras Calderón, y Otros 2011) (49)
Carambolo (<i>Averrhoa</i>	81,03 ± 1.97 (mg Trolox/ 100g)	36,04 ± 1,63	Fu, y col, 2011. (48)
		54,45 ± 0.43	Ayub Ali, Inaotombi Devi,

<i>carambola L)</i>			Nayan, Chanu, & Ralte, 2010. (51).
Mango (<i>Mangifera indica L)</i>	65.24 ± 0.61 (mg Trolox/ 100g)	35.02 ± 1.43	Fu, y col, 2011. (48).
Curuba (<i>Passiflora edulissims)</i>	95,17 ± 1,76 (mg Trolox/ 100g)	66,73 ± 1,35	Ayub Ali, Inaotombi Devi, Nayan, Chanu, & Ralte, 2010. (51)
Coco (<i>Cocos nucifera L)</i>	16,60 ± 0,3 (mg Trolox/ 100g)	22,79 ± 0,63	Ayub Ali, Inaotombi Devi, Nayan, Chanu, & Ralte, 2010. (51)
Lulo		650	Mertz, y otros, 2009. (52)
Guayaba (<i>Psidium guajava)</i>		148 ± 8.4 29,8 ± 17,7 50,8 ± 4,7	Patthamakanokporn, y otros, 2008. (23)
	61.9 ± 0.38 (µg Trolox/ 100g)	309 ± 6.81	Contreras Calderón, y Otros 2011. (49)
Borojó (<i>Borojoa Patinoi Cuatrec)</i>		600-800	Sotelo, Casas, & Camelo, 2010. (2)
	3,88 ± 0.5 (µg Trolox/ 100g)	41,8 ± 1,53	Contreras Calderón, y Otros 2011 (49)
Guanábana (<i>Annona muricata)</i>		42	Lako, y otros, 2007. (53)
Mora		4250 – 6300	Mertz, y otros, 2009. (52)
Maracuyá (<i>Passiflora edulis)</i>		61 ± 32	Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008. (54)
Mamoncillo (<i>Melicoccus bijugatus)</i>		32.3 ± 0.38	Bystroma, Lewis, Brown, Rodriguez, & Obendorf, 2008. (55)
Granadilla (<i>Passiflora ligularis L.)</i>		238 ± 86	Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008. (54)
Piña (<i>Ananas sativus)</i>		34.7 - 54.7	Allothman, Bhat, & Karim, 2009. (50)
		38.1 ± 0.7	Almeida, y otros, 2011. (56)

El Boroj  (*Borojoa Patinoi cuatrec*) se han cuantificado contenido de polifenoles totales que oscila entre $41,8 \pm 1,53$ (49) y 600 - 800 mg ácido gálico/100gr (2), entre los que se han encontrado importantes cantidades de  cido Gálico, Rutina, Resveratrol, Epicatequina y Catequina. La rutina ha sido estudiada como Inhibidora de la angiogénesis, además de Importante antioxidante ligando iones Fe^{2+} y radicales $OH\cdot$ (57) (34), en el resveratrol se ha evaluado su capacidad como regulador de azucares inhibiendo la actividad aldosa reductasa, mejorando la sensibilidad a la insulina y aumentando la función mitocondrial (58), mientras que Catequinas de la familia de las Leguminosas se ha encontrado como agente alelopático – plaguicida y fungicida natural (59).

La quercitina es uno de los flavonoles con mayor presencia en frutas y vegetales, en frutas cítricas los principales bio - flavonoides encontrados han sido la hesperidina, rutina, tangeretina, diosmetina, narirutina, neohesperidina, naringenina, nobiletina y quercetina (35). Mientras que en el mangostino han sido identificados diez ácidos fenólicos, entre los que se destacan el protocatéquico, ácido p - hidroxibenzoico, ácido m-hidroxibenzoico, 3,4–dihidroxi mandelico (60).

Ribeiro y col. realizaron una caracterización de los compuestos fenólicos en cuatro variedades de mango, en donde hallaron un total de 12 flavonoides y xantonas, además de diferencias significativas en el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante entre los mismos (61).

Por otro lado Faller y Fialho, estudiaron el efecto del tipo de agricultura (orgánica y convencional) en el contenido de fenoles en frutas y vegetales, encontrando mayor susceptibilidad a este factor por parte de las frutas analizadas, en este caso banana, naranja, manzana, papaya, mango y mandarina, con un importante incremento en pulpa de papaya hasta de un 88.8% en polifenoles solubles y 71.2% en polifenoles hidrolizables (47).

2.5 USOS POTENCIALES EN LA INDUSTRIA

Industria alimentaria: Un mercado muy importante y poco evaluado en cuanto al contenido de fenoles es el desarrollo de frutas y vegetales orgánicos de alto contenido antioxidante, según Faller y Fialho una disminución en el uso de productos químicos durante el cultivo, provocaría un estrés mayor en las plantas y una mayor producción de compuestos polifenólicos como medio defensivo ante agentes externos (47). Por otro lado, Palacios, Burtin y Leech han realizado trabajos en la secuenciación de los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios en plantas tropicales y la expresión heteróloga de las mismas en bacterias o levaduras, para su caracterización cinética y bioquímica, con el fin de incrementar la producción de metabolitos secundarios o generar mayor diversidad química en plantas, microorganismos *in vitro* (42). Diferentes compuestos fenólicos extraídos principalmente del té se han utilizado en productos lácteos, como saborizantes en queso y como colorantes en yogurt y helados (62), Además, en relación al consumo de alimentos con alto contenido de compuestos fenólicos, se ha realizado seguimiento *in vivo* a consumidores de este tipo de alimentos, descartándose incrementos en el contenido de compuestos fenólicos en la sangre, el objetivo es llegar a comprender como estos hacen parte bio-activa del metabolismo humano para la formulación de medicamentos y fibras dietarías en base de los mismos (29) (63).

Curtiembre y plaguicidas: Los taninos por ser sustancias capaces de precipitar las proteínas de la piel son utilizadas en curtiembre, y en formulaciones de uso tópico para el tratamiento de lesiones poco profundas (40). Por otro lado, debido a que dan a las plantas resistencia al ataque de insectos, pájaros y enfermedades de origen fúngico y microbiano (38) (39), son una buena alternativa en el desarrollo de productos naturales para el control de plagas.

Industria Cosmética y farmacéutica: Estudios desarrollados por varios autores han demostrado la capacidad de interacción entre compuestos polifenólicos y diferentes enzimas responsables del deterioro de la salud humana, entre las que se encuentran la isoprenilcisteina carboxi metiltransferasa (64), enzima involucrada en procesos de transducción en la ruta Ras-ERK y la cual se encuentra asociada a procesos oncogénicos en células humanas (65) (66) (67). Trabajos realizados en enzimas asociadas a la hidrólisis del ácido hialurónico, hialuronatos y colageno (Hialuronidasas y colagenasas), han demostrado gran potencial en la utilización de compuestos polifenólicos de origen vegetal en la inhibición de éstas enzimas, dejando aún a consideración los mecanismos sinérgicos en los que se llevan a cabo (68) (69) (70).

2.6 CONCLUSIONES

En varios estudios se ha comprobado la presencia de diferentes componentes polifenólicos de interés medicinal e industrial en frutas de consumo regular, y aunque el consumo de estas puede contribuir a la reducción del riesgo de adquirir diferentes tipos de patologías, poca información se halla disponible en la literatura que aclare si el consumo de estos compuestos en cierta cantidad pudiera incidir en el desarrollo de otro tipo de enfermedades, por esta razón se deben seguir evaluando alternativas en las que su utilización no sea exclusivo a la ingesta humana, hasta que se comprenda con certeza el papel bio-activo que tienen los diferentes polifenoles en el metabolismo humano. Por otro lado, además de su papel en la prevención de enfermedades, también se ha evidenciado el efecto positivo que tienen los polifenoles como mecanismo defensivo de las plantas ante agentes de estrés externos. Estas características dejan abiertas diferentes alternativas de desarrollo de productos en diferentes sectores en las que Colombia por su alta biodiversidad en frutas tropicales debe aún explorar e investigar.

3. CAPITULO III: EXTRACCIÓN, CINÉTICA Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA DEL BOROJÓ.

3.1 RESUMEN

El Borojón (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas) es una planta perteneciente a la familia Rubiáceae. El fruto en sus primeros estados es verde claro, al madurar se torna pardo rojizo presentándose un ablandamiento importante de la pulpa. Las PFO(s) en presencia de oxígeno catalizan dos reacciones: la hidroxilación de monofenoles a difenoles y la oxidación de polifenoles a quinonas, los cuales son posteriormente polimerizados en pigmentos oscuros.

En este estudio se hizo una caracterización preliminar de la enzima PFO del Borojón en dos estados de maduración clasificados por la relación entre acidez titulable y grados brix; para lo cual se analizaron micro-estructuralmente los frutos, obteniendo diferencias conformacionales en las estructuras celulares en los dos estados de maduración, contenido de fenoles totales, el cual se determinó por el método de Folin – Ciocalteu (750 nm) con valores para el Borojón verde de 284.02 ± 32.19 , 115.85 ± 13.48 y 73.48 ± 3.36 mg ac. gálico/l para los extractos acuoso y gel del Borojón maduro respectivamente, se cuantificaron las proteínas utilizando ácido bicinconínico (595 nm) encontrando mayor contenido en el Borojón Maduro (3,68% p/p), se visualizaron las cinéticas de pardeamiento empleando como sustrato catecol 100 mM, obteniendo V_{max} de 13333.33 (U/(min*mL)) en extractos acuosos de Borojón verde (EAV), mientras que en los extractos de Borojón maduro se obtuvieron valores de 5208.33 y 5747.13 (U/(min*mL)) en el acuoso (EAM) y gel (EGM) respectivamente. Los valores de K_m obtenidos fueron de 0.15, 0.24 y 0.12 M para EAM, EGM y EAV respectivamente.

Este estudio evidenció una mayor actividad de la PFO en Borojón en estado verde y baja en estados avanzados de maduración, demostrando la importancia en investigar acerca de las condiciones óptimas durante la cosecha y almacenamiento con el fin de disminuir la actividad de las PFO durante el proceso

de senescencia, prolongar la vida útil de este fruto y conservar los polifenoles, los cuales poseen un gran interés en la industria por sus múltiples funciones.

Palabras clave: polifenoles, pardeamiento, polifenol oxidasa, Borojó.

3.2 INTRODUCCION

Las PFO(s) son un grupo de oxidorreductasas con centro dinuclear de cobre, de las cuales se ha reportado pesos moleculares entre 45 y 67 kDa (71); estas desempeñan un papel importante en muchos procesos metabólicos en las plantas, entre los que se les atribuye la resistencia a stress y patógenos, defensa contra herbívoros, patogenicidad y reacciones de defensa fúngica (72), variando de acuerdo al grado de madurez en los frutos, en el banano se han realizado investigaciones en donde se han demostrado diferentes niveles de actividad de esta enzima de acuerdo al grado de madurez del mismo (73). Esta actividad es responsable del pardeamiento enzimático de frutas y verduras (74) la cual es ocasionada por daños celulares ya sea durante el proceso normal de maduración o durante el procesamiento y tratamiento de los frutos (75), en muchas publicaciones se reportan correlaciones de la actividad PFO con factores ambientales, ataques por patógenos y cambios durante el procesamiento o almacenamiento de alimentos (72) (76).

En presencia de oxígeno esta enzima, cataliza dos reacciones: la hidroxilación de monofenoles a difenoles (monofenolasa EC 1.14.18.1) y la oxidación de catecoles a quinonas (difenolasa CE 1.10.3.1) (Figura 7), la mayoría de los cuales son posteriormente polimerizados a pigmentos oscuros, lo que genera una de las principales causas de rechazo de productos de origen agrícola (77).

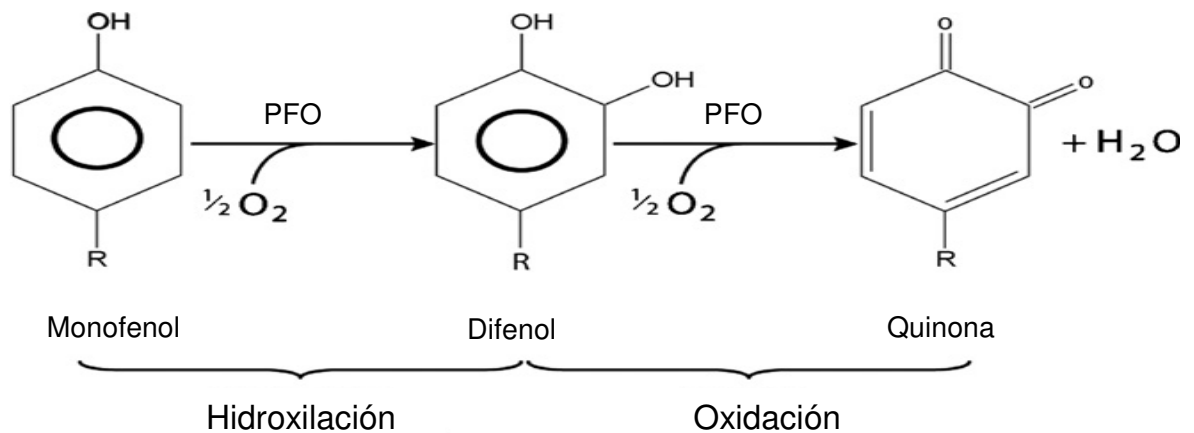


Figura 7. Procesos de hidroxilación y oxidación de las PFO's (75).

La extracción, purificación y análisis de actividad enzimática PFO se ha llevado a cabo en diferentes productos agrícolas como la manzana (78), cereza (79), habichuela verde (80), lechuga (71), Brócoli (77), vaina de la vainilla (74), o puré de fresa tratado a altas presiones (81); lo que demuestra su alta presencia en productos agroindustriales y la importancia de entender su actividad en cada uno de ellos, con el fin de manejar el posible impacto de esta enzima en tratamientos pre y post-cosecha.

3.3 MATERIALES Y METODOS

3.3.1 Material Vegetal

El fruto de Borojó (*Borojoa patinoi cuatrec*) en estado previo a su cosecha y maduro fue adquirido de proveedores locales en la ciudad de Villavicencio. De forma manual se removieron las semillas de la fruta, para obtener la pulpa la cual se almacenó en bolsas de polietileno de baja densidad con banda hermética abre-cierre (Ziploc®) a una temperatura de 4 °C hasta su utilización.

3.3.2 Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico.

Solución de ácido Bicinconínico (B9643), Polivinil Polipirrolidona (PVPP) y ácido gálico fueron adquiridos de la marca Sigma Aldrich Chem. Co. ®.

Hidróxido de Sodio (NaOH), Albumina fracción V de suero Bovino, Reactivo de Folin – Ciocalteau, Fosfato Di-sódico Anhidro (Na_2HPO_4), Yodo molecular y yoduro potásico para la preparación de la solución lugol, fueron adquiridos de la marca Merck A.G ®, fosfato mono potásico (KH_2PO_4) Carlo Erba ®, azul de metileno Re 500GM Q473-07 J.T. Baker ®, sulfato pentahidratado de Cobre (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) Scharlau ®.

Para la preparación de soluciones y buffers así como para las mezclas de reacción durante las mediciones espectrofotométricas fue utilizada agua destilada.

3.3.3 Análisis Morfo estructural Del Fruto

Se realizaron cortes longitudinales al material vegetal, para posteriormente ser observados en un microscopio óptico Nikon eclipse E100 ® (Melville, New York, USA) a dos niveles de aumento (10x y 40x) con tinciones de lugol y azul de metileno.

3.3.4 Determinación del índice de madurez.

El índice de madurez del material vegetal utilizado se determinó por medio de la relación entre contenido de sólidos solubles (°Brix) y el % de acidez titulable del fruto expresado en porcentaje de ácido cítrico (82).

La determinación de los sólidos solubles se obtuvo empleando un refractómetro digital marca ATAGO, modelo 3810 pal-1 (Tokyo – Japón). Las muestras fueron maceradas a temperatura ambiente por 3 minutos, una vez obtenida una fracción líquida, esta se colocó en el lente del refractómetro.

Las pruebas de acidez se realizaron por triplicado en un titulador automático 702 SM titrino – 703 Stand Metrohm Ltd. (Herisau – Suiza). En donde 1 gramo del fruto fue homogenizado en 10 mL de agua destilada y se tituló con NaOH 0.1 N hasta un pH de 8.1, expresando el porcentaje de acidez en porcentaje de ácido cítrico, por ser uno de los ácidos de mayor contenido en frutos utilizando la siguiente expresión (83):

Porcentaje de Acidez (Ec. 1).

$$\text{Porcentaje Acidez (\%)} = \frac{(V * C * F * 100\%)}{M}$$

En donde:

F: Factor para ácido cítrico: 0.064

V: Volumen de NaOH 0.1 N expresado en mL

C: Concentración del NaOH

M: Peso analito expresado en gramos

3.3.5 Obtención de extractos enzimáticos.

Los extractos enzimáticos fueron preparados siguiendo el protocolo descrito por Ayaz y Ozen con algunas modificaciones (84) (85): 50 g de pulpa fueron homogenizados por 2 minutos en 100 mL solución tampón fosfato 100 mM (pH 7.1) y 1% Polivinil Polipirrolidona (p/p) con un Ultra-Turrax T25 Junke & Kunkel IKA® - Labortechnik (Staufen – Alemania). El homogenizado fue almacenado a 4 °C durante 60 minutos previo a su centrifugación, la cual se llevó a cabo a 9000 rpm por 30 min a 4 °C en Centrifuga Hettich® Universal 32R (Tuttlingen – Alemania).

Después de la centrifugación se obtuvieron las siguientes fases:

En el Borojó maduro una fase acuosa (EAM), una fase intermedia con una textura gel (EGM) y fibras no solubles las cuales se separaron manualmente (Figura 8).

En el Borojó en estado pre-cosecha una fase acuosa (EAV), y fibras no solubles las cuales se separaron manualmente.

Estos diferentes extractos fueron almacenados y conservados a -20 °C hasta su utilización y/o liofilización.

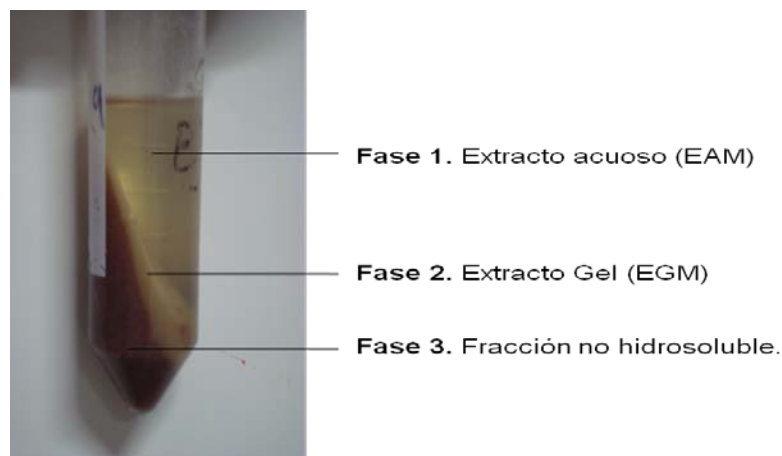


Figura 8. Fases obtenidas en el Borjón Maduro después de la centrifugación. (Fuente: Universidad de La Sabana (2011))

3.3.6 Cuantificación de polifenoles.

Se cuantificó el contenido de polifenoles presentes en los extractos por el método de Folin- Ciocalteau (86). Por triplicado en un balón aforado de 25 mL se adicionó 1 mL de extracto de Borjón, 5 mL de agua destilada y 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos de reacción, se adiciono 1 mL de carbonato de sodio al 7% y se aforó a 25 mL con agua destilada; se dejó reaccionar por 90 minutos alejado de la luz. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo–Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). El contenido de polifenoles se expresó por medio de una curva de calibración estándar, en mg eq-ácido gálico/100g fruto (ANEXO 1).

3.3.7 Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas en los extractos se utilizó un kit de ácido bicinconinico, para lo cual 8 mL de solución de ácido bicinconinico fueron mezclados con 0.16 mL de una solución al 4% de sulfato de cobre pentahidratado (87) hasta la formación estable de color verde, a 2 mL de esta solución se le agregó 0.1 mL del extracto a evaluar, incubando en ausencia de luz durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se midió su absorbancia a

595 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo – Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), por medio de una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino se determinó la concentración de proteína en % (p/p) (ANEXO 2).

3.3.8 Ensayo De La Actividad Polifenoloxidasas (PFO)

La actividad PFO se ensayó midiendo el cambio en absorbancia a una longitud de onda de 415 nm, determinada experimentalmente por barrido espectral del analito (ANEXO 3) en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS Thermo - Scientific) utilizando como sustrato 400 µl de catecol 0,1 M en 1400 µl de buffer fosfato 0.1 M pH 7.1, en presencia de 200 µl del extracto enzimático. La absorbancia fue leída durante 10 minutos de reacción desde el momento de la adición del Catecol, con un intervalo de lectura de 10 segundos. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que causa un incremento en la absorbancia de 0,001/min de acuerdo a la siguiente expresión (84) (88) (71):

$$U(t) = \frac{Abs(t) - abs(0)}{0.001t}$$

Definición de unidad enzimática para la actividad PFO (Ec. 2).

3.3.9 Evaluación De Propiedades Enzimáticas

La medición de las diferentes propiedades enzimáticas se llevaron a cabo en un lector de microplatos marca BIO–RAD iMarck™, utilizando como sustrato 60 µl de catecol 0,1 M en 210 µl de buffer, en presencia de 30 µl del extracto enzimático.

3.3.9.1 Efecto del pH en la actividad PFO

La actividad PFO, en función del pH se determinó en un rango de pH 3 a 8 utilizando una solución 100 mM de catecol como sustrato. Los buffers utilizados para obtener los rangos de pH fueron: buffer citrato 0.5 M (pH 3 a 5),

buffer fosfato 0.1 M (pH 6.0 a 7.5) y buffer Tris – HCl (>pH 8). Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado para cada uno de los extractos.

3.3.9.2 Efecto de la Temperatura en la actividad PFO

La temperatura óptima para la actividad PFO fue determinada midiendo la actividad enzimática a diferentes temperaturas (5, 20, 40, 60 y 90 °C)

El buffer y el sustrato (catecol 100 mM) fueron incubados 5 minutos a las diferentes temperaturas, previo a la adición de los extractos enzimáticos. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado para cada uno de los extractos.

3.3.9.3 Especificidad con el sustrato y cinética enzimática

Los parámetros cinéticos V_{max} y K_m de actividad enzimática de la PFO, fueron evaluados utilizando diferentes concentraciones de catecol. Las concentraciones evaluadas fueron: 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.16 y 0.3 M. Se usó buffer fosfato 0,1 M pH 7.1, con un tiempo de reacción de 30 segundos; cada ensayo enzimático se realizó por triplicado.

Los datos fueron graficados como $1/\text{Velocidad}$ (min/ μmol) contra $1/\text{concentración de sustrato}$ (1/mM). Las constantes de Michaelis–Menten (K_m) y velocidad máxima (V_{max}) fueron obtenidas a partir de la pendiente y el intercepto con el eje de las ordenadas. La especificidad con el sustrato (V_{max}/K_m) fue calculado usando los datos obtenidos a partir de la gráfica de Lineweaver–Burk (84).

3.3.10 Evaluación preliminar de los perfiles proteicos por electroforesis

SDS-PAGE.

Los extractos obtenidos y liofilizados fueron sometidos a electroforesis como se describe a continuación:

Reactivos: Acrilamida, bis-acrilamida, Tris (tris hidroximetil amino metano), Tris-HCl (tris hidroximetil amino metano hidrociorhídrico), persulfato amónico,

TEMED, glicina, SDS (dodecil sulfato sódico), β -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, ácido acético, metanol, azul de Coomassie.

Preparación del geles: Gel de Resolución o Separador 12% T (concentración de monómeros de acrilamida y bisacrilamida), 2.6% C (concentración de polímeros reticulados). Gel de Concentración (4% T, 0.1% C).

Equipo y condiciones electroforéticas. Se utilizó un equipo de electroforesis mini– Protean BIO-RAD (California – USA). La separación de las proteínas a través del gel se llevó a cabo a una intensidad constante de 10 mA a su paso por el gel de concentración, aproximadamente durante 30 min., para cambiar a una intensidad de 15 mA en el gel de separación, durante 150 min. Se separó el gel de los vidrios y se introdujo durante 10 minutos en la solución fijadora, posteriormente se realizó la coloración durante 30 minutos, finalmente el gel se decolora durante 2 horas (89).

3.3.11 Análisis Estadístico

Para evaluar los resultados estadísticamente, se realizaron análisis de varianzas de un factor en las mediciones de proteína y polifenoles totales; mientras que para analizar las pruebas en las que se involucraban dos factores se utilizaron modelos lineales generales con comparaciones múltiples de Tukey entre los factores y sus correspondientes niveles, con un nivel de confianza del 95%. Para el procesamiento de la información se utilizó el software Minitab ® para Windows versión 15.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSION

3.4.1 Análisis Morfo estructural Del Fruto

Se observaron diferencias importantes en las conformaciones estructurales de los tejidos del Borojó en los dos estados de maduración; para el caso del Borojó maduro se observaron paredes celulares gruesas, con células sin un orden específico, elipsoides y en algunos casos alargadas (Figura 9 a, b), mientras que

para el Borojón verde se observó una estructura compacta, semi – uniforme y mejor definida (Figura 10).

Mediante la tinción con azul de metileno se observó presencia de celulosas en las paredes celulares (Figura 9 e, f y Figura 10 c, d), mientras que las muestras con tinción de lugol permitieron identificar la formación de tejido parénquimático de reserva en el Borojón maduro ausente en el Borojón verde, este tejido hace parte de la estructura carnosa en frutos con alto contenido de almidones (90), con presencia de células de gran tamaño comparadas a las circundantes (Figura 9 c, d) (Figura 10 c, d).

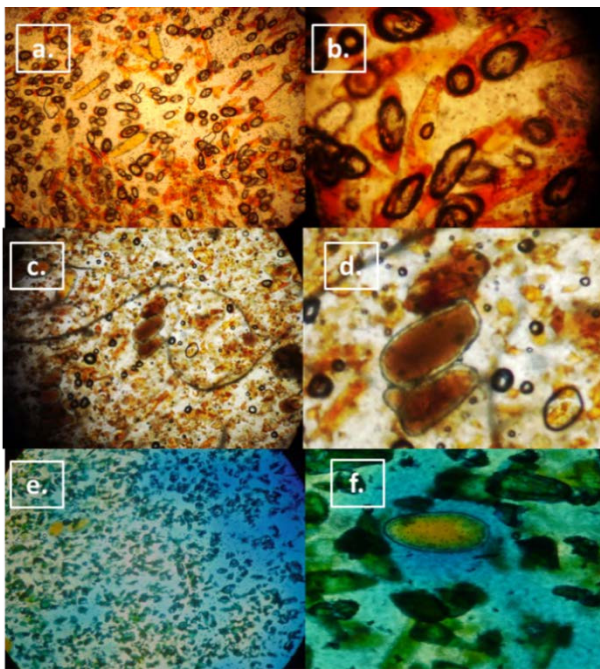


Figura 9. Microscopia óptica del fruto del Borojón Maduro.
a) Sin tinción 10x; b) sin tinción 40x; c) Tinción lugol 10x; d) Tinción lugol 40x; e) Tinción azul de metileno 10x; f) Tinción azul de metileno 40x.

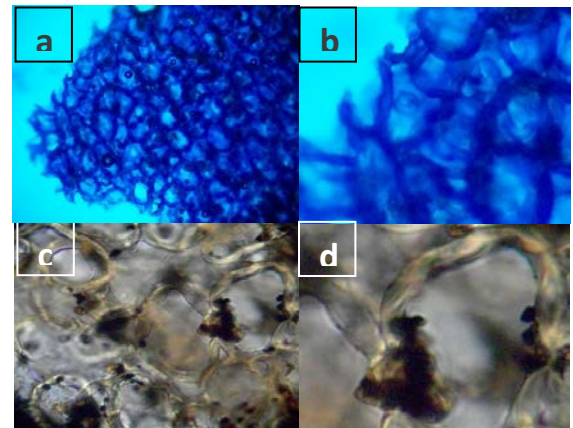


Figura 10. Microscopia óptica del fruto del Borojón Verde.
a) Tinción azul de metileno 10x; b) Tinción azul de metileno 40x; c) Tinción lugol 10x; d) Tinción lugol 40x.

3.4.2 Índice De Madurez

En la Tabla 2 se reportan los valores obtenidos para la determinación del índice de madurez de los frutos utilizados en el estudio, en donde se encontró mayor índice de madurez en el Borojón Maduro debido al mayor contenido de sólidos solubles

provenientes del tejido parénquimático de reserva de almidones del Borojé maduro.

De acuerdo a los resultados se obtuvo un índice de madurez aproximadamente tres veces mayor para el Borojé Maduro utilizado durante las experimentaciones.

Tabla 2. Índice de madurez para el Borojé verde y maduro.

	<i>ACIDEZ (% ácido cítrico)</i>	<i>°Brix</i>	<i>Ind. Madurez.</i>
VERDE	0.323 ± 0.005	0.5	1.546
MADURO	2.833 ± 0.005	13.33	4.706

3.4.3 Cuantificación de Polifenoles.

Para la cuantificación del contenido polifenoles de los extractos se obtuvo valores de 115.85 ± 13.48 , 284.02 ± 32.19 y 73.48 ± 3.36 mg eq-ácido gálico/100g como contenido fenólico para EAM, EAV y EGM respectivamente (Figura 11.), resultados obtenidos por Sotelo y colaboradores muestran un mayor contenido de polifenoles (600 - 800 mg/100g de ácido gálico) en el Borojé maduro, ésta diferencia se debe principalmente a los solventes de extracción utilizados, para los que se ha encontrado mayor solubilidad de los polifenoles utilizando como solventes etanol y acetona (91). Con respecto al grado de madurez, se observaron diferencias significativas entre el contenido de polifenoles totales del Borojé Verde con los extractos acuoso y gel del Borojé maduro (ANEXO 3), esto se confirma con lo reportado por algunos autores, quienes reportan un decrecimiento gradual en el contenido de fenoles durante los procesos de maduración de los frutos (92) (84).

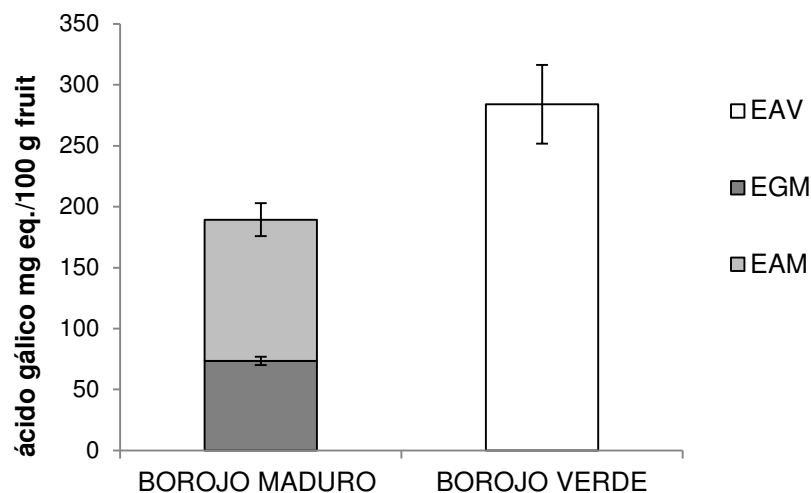


Figura 11. Cuantificación de polifenoles totales para cada uno de los extractos.

3.4.4. Cuantificación De Proteínas.

Se obtuvieron contenidos proteicos de $1.72 \pm 0.31\%$, $1.96 \pm 0.12\%$ y $2.34 \pm 0.14\%$ para las muestras EGM, EAM y EAM respectivamente (Figura 12); observándose diferencias significativas entre los extractos de Borojó maduro y Borojó verde (ANEXO 4), donde el contenido proteico total en el Borojó maduro (3.68%) es mayor al Borojó verde. Salamanca y col. han reportado contenido proteico en el Borojó maduro de 0.71 ± 0.03 en % p/p (9), mientras que Orduz y colaboradores reportan valores de proteína entre 0.8 y 1.3 en % p/p (93), éstas diferencias se pueden deber a diversos factores que radican desde el origen de la materia prima hasta las condiciones de experimentación.

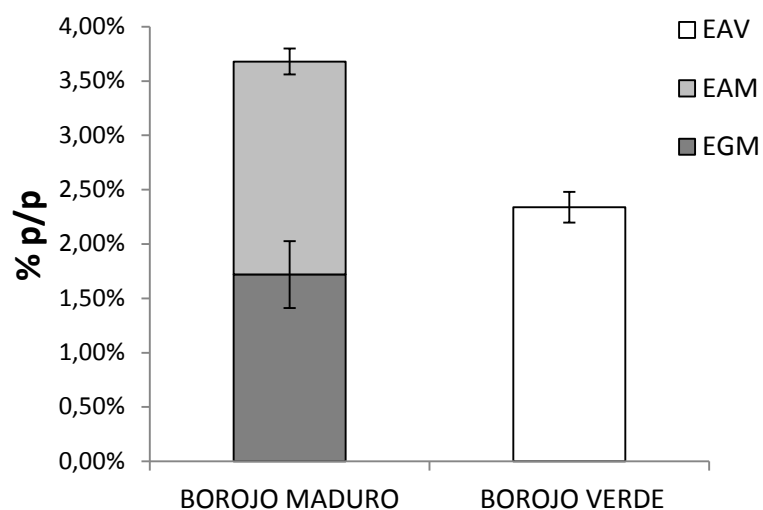


Figura 12. Cuantificación de proteínas para cada uno de los extractos.

3.4.5 Ensayo De La Actividad Polifenoloxidasa (PFO).

En la Figura 13 se graficó el cambio en la actividad enzimática de la PFO en el tiempo mostrando comportamientos similares en los extractos de Borojón Maduro alcanzando actividades máximas de 306,21 y 290.9 U/mg para EAM y EGM respectivamente, mientras que EAV presento una mayor actividad inicial alcanzando una actividad de 863,46 U/mg de actividad máxima, llegando a actividades cercanas a los extractos de Borojón Maduro a partir de los 7 minutos aproximadamente con una mayor tasa de conversión de sustrato para los extractos maduros, esto posiblemente a la presencia aún mayor de sustrato debido a la baja conversión inicial del mismo por la PFO presente en los extractos de Borojón Maduro.

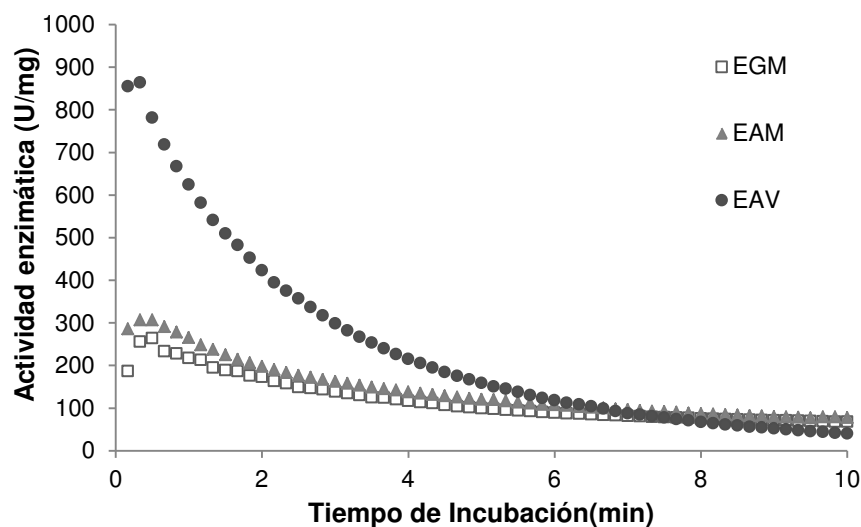


Figura 13. Cambio en la actividad PFO de los extractos enzimáticos en el tiempo.

3.4.6. Evaluación de propiedades enzimáticas.

3.4.6.1 Efecto del pH en la actividad PFO

En la Figura 14 se muestran los perfiles de pH para los diferentes extractos, obteniendo una actividad PFO mayor en los extractos a pH entre 5 y 6.2, demostrando una mayor actividad a pH 5 para el extracto gel, mientras que el extracto Acuoso de Borojó Maduro presento una mayor actividad a pH 6.2; para el extracto acuoso de Borojó Verde no hubo diferencias significativas entre las actividades enzimáticas halladas a estos pH.

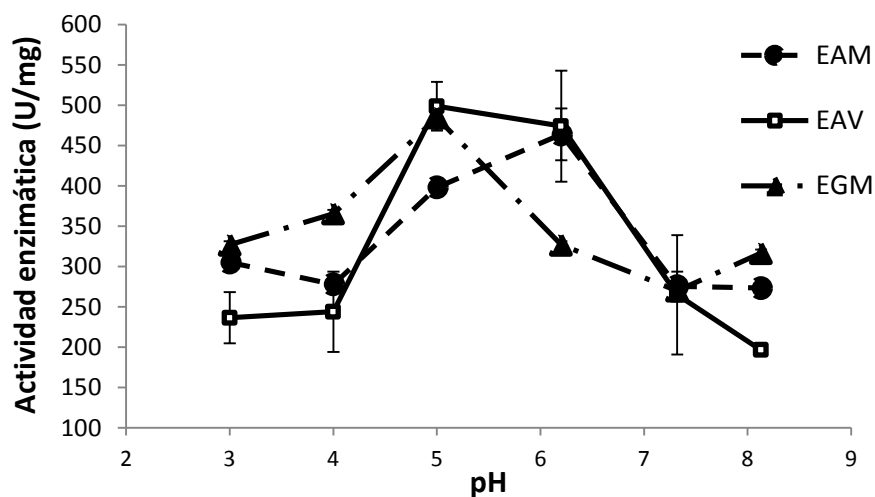


Figura 14. Efecto del pH en la actividad PFO

En la Gráfica de componentes principales para el efecto del pH y grado de maduración del fruto en la actividad PFO de los diferentes extractos (Figura 15), se pudo observar una menor actividad media para EAV y una mayor actividad en EGM, debido principalmente a que el efecto del pH en la actividad promedio de la PFO de Borojón como se había mencionado anteriormente fue menor a pH 5, mostrando un fuerte decrecimiento de la actividad PFO a pHs menores a 5 y mayores a 6.2 principalmente en EAV.

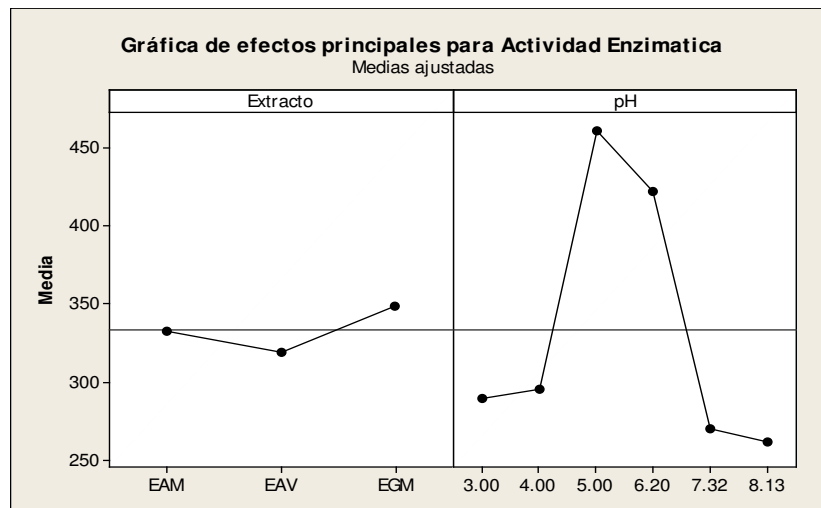


Figura 15. Grafica de componentes principales para el efecto del pH.

En la Tabla 3, se muestra el resumen de las pruebas comparativas entre cada uno de los factores en sus diferentes niveles, se pudo observar que EAM presentó diferencias significativas con EAV a pH 5 y con EGM a pH 6.2, mientras que entre EAV y EGM se presentaron diferencias significativas a pHs de 4, 6.2 y 8.13. El pH del fruto de Borojón, como en otras plantas y frutos es ácido, para los cuales se han reportado pHs óptimos de actividad PFO entre 3 y 7 (80) (84) (94) (79), sin embargo este amplio rango de pH óptimo también depende de factores como el sustrato, la temperatura, la naturaleza de la enzima y las condiciones de extracción de la misma (74).

Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto del pH y grado de maduración en la actividad PFO.

	pH	EAM						EAV						EGM					
		3,0	4,0	5,0	6.2	7.32	8.13	3,0	4,0	5,0	6.2	7.32	8.13	3,0	4,0	5,0	6.2	7.32	8.13
EAM	3																		
	4	a																	
	5	b	b																
	6.2	b	b	a															
	7.32	a	a	b	b														
	8.13	a	a	b	b	a													
EAV	3	a	a	b	b	a	a												
	4	a	a	b	b	a	a	a											
	5	b	b	b	a	b	b	b	b										
	6.2	b	b	a	a	b	b	b	b	a									
	7.32	a	a	b	b	a	a	a	a	b	b								
	8.13	b	a	b	b	a	a	a	a	b	b	a							
EGM	3	a	a	a	b	a	a	a	a	b	b	a	b						
	4	a	a	a	b	a	a	b	b	b	b	b	b	a					
	5	b	b	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b	b	b				
	6.2	a	a	a	b	a	a	a	a	b	b	a	b	a	a	b			
	7.32	a	a	b	b	a	a	a	a	b	b	a	a	a	b	b	a		
	8.13	a	a	a	b	a	a	a	a	b	b	a	b	a	a	b	a	a	

a = no hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

b = hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

3.4.6.2 Efecto de la Temperatura en la actividad PFO

En la Figura 16 se observan los perfiles de temperatura para los extractos, observándose un comportamiento notoriamente diferente en el extracto de Borjón Verde, la temperatura óptima de actividad para los tres extractos estuvo entre 45 y 70°C, temperaturas por encima y debajo de éstas ocasionaban pérdidas de actividad PFO en los tres extractos.

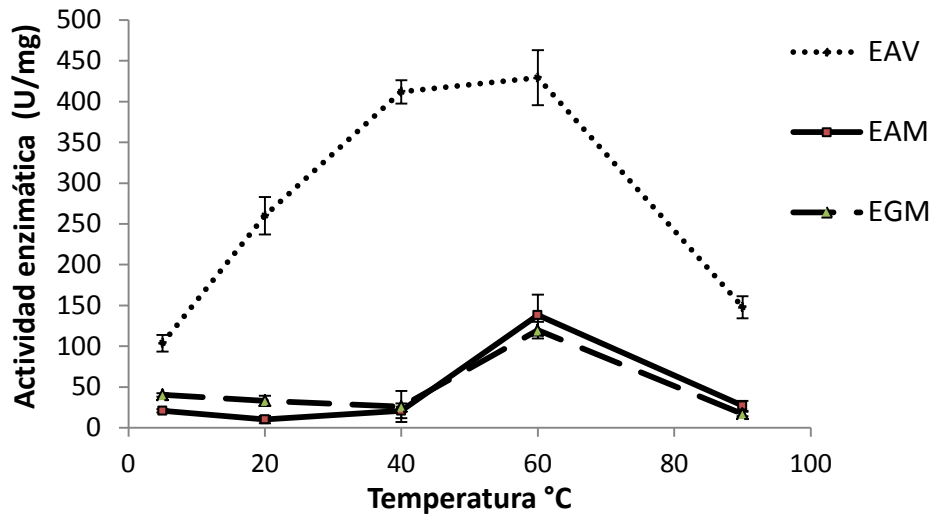


Figura 16. Efecto de la Temperatura en la actividad PFO.

El análisis individual de los factores permitió observar una alta actividad promedio en EAV a las diferentes temperaturas; en cuanto a la influencia de la temperatura en la actividad promedio de la PFO se encontró el valor más alto de actividad a 60 °C (Figura 17).

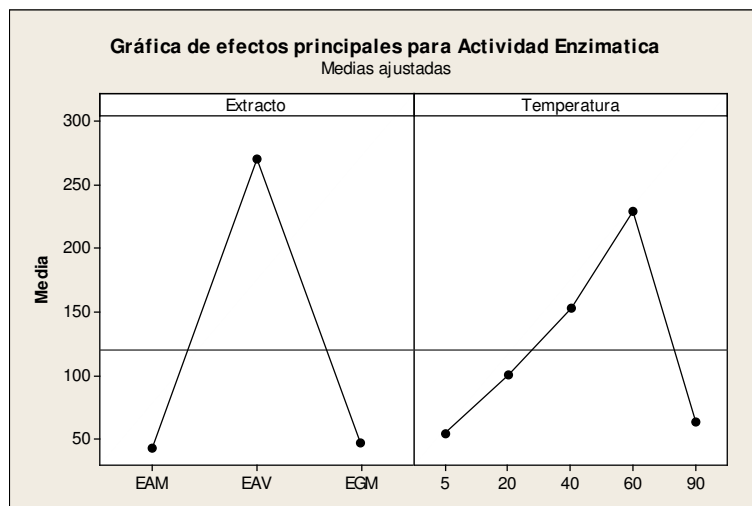


Figura 17. Gráfica de componentes principales para el efecto de la Temperatura.

Sin embargo, en el análisis comparativo entre los factores y sus niveles permitió observar actividades similares entre EAM y EGM sin diferencias significativas entre estos en cada una de las temperaturas tratadas, presentándose diferencias significativas en el comportamiento y capacidad de oxidación de ésta enzima

debido principalmente al grado de maduración del fruto, hallando diferencias significativas en la actividad de EAV con EAM y EGM en todas las temperaturas tratadas (Tabla 4). En algunos estudios se han reportado temperaturas óptimas entre 30 y 60 °C para ésta enzima, dependiendo al igual que en el pH de factores de experimentación y de la naturaleza de la enzima (74) (79) (95).

Tabla 3. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto de la temperatura y el grado de maduración en la actividad PFO (ANEXO 7).

	Temp (°C)	EAM					EAV					EGM				
		5	20	40	60	90	5	20	40	60	90	5	20	40	60	90
EAM	5															
	20	a														
	40	a	a													
	60	b	b	b												
	90	a	a	a	b											
EAV	5	b	b	b	a	b										
	20	b	b	b	b	b	b									
	40	b	b	b	b	b	b	b								
	60	b	b	b	b	b	b	b	a							
	90	b	b	b	a	b	a	b	b	b						
EGM	5	a	a	a	b	a	b	b	b	b	b					
	20	a	a	a	b	a	b	b	b	b	b	a				
	40	a	a	a	b	a	b	b	b	b	b	a	a			
	60	b	b	b	a	b	a	b	b	b	a	b	b	b		
	90	a	a	a	q	a	b	b	b	b	b	a	a	a	b	

a = no hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

b = hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

3.4.6.3 Especificidad con el sustrato y cinética enzimática

El efecto de la concentración de catecol en la velocidad de reacción de la enzima PFO para los diferentes extractos se puede observar en la Figura 18, en donde se observó un comportamiento creciente en los tres extractos principalmente en EAV. Para EGM y EAM hubo un comportamiento similar hasta una concentración de 0.1

M, a partir de la cual hubo un mayor crecimiento en la velocidad de oxidación de sustrato por parte de EAM.

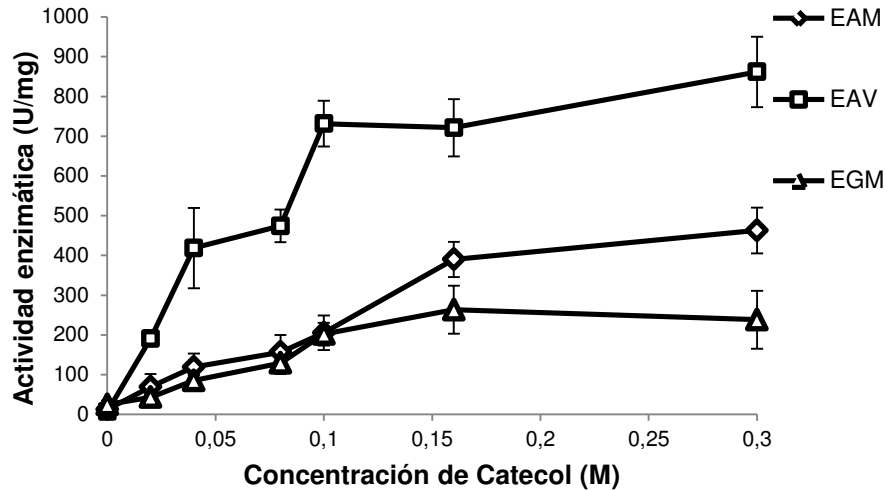


Figura 18. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad PFO.

El análisis individual de los factores (Figura 19), permitió observar una mayor actividad promedio en los extractos obtenidos del Borojé Verde, y un comportamiento creciente en la actividad oxidativa con el aumento de concentración de sustrato en los tres extractos.

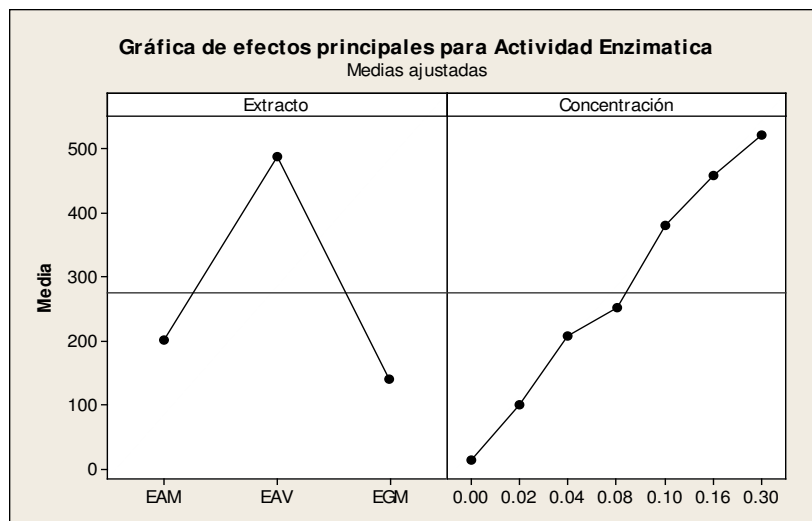


Figura 19. Grafica de componentes principales para el efecto de la Concentración de sustrato.

Sin embargo, como se indica en la Tabla 5, EAV presento diferencias significativas con EAM y EGM en la actividad enzimática a concentraciones por encima de 0.02 M, mientras que EAM presentó diferencias significativas con la capacidad oxidativa en EGM cuando la concentración de sustrato es 0.3 M

Tabla 4. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto de la concentración de sustrato y grado de maduración en la actividad PFO (ANEXO 8).

	Conc. (M)	EAM						EAV						EGM									
		0	0.02	0.04	0.08	0.1	0.16	0.3	0	0.02	0.04	0.08	0.1	0.16	0.3	0	0.02	0.04	0.08	0.1	0.16	0.3	
EAM	0																						
	0.02	a																					
	0.04	a	a																				
	0.08	a	a	a																			
	0.1	a	a	a	a																		
	0.16	b	b	b	b	b																	
	0.3	b	b	b	b	b	a																
EAV	0	a	a	a	a	b	b	b															
	0.02	b	a	a	a	a	b	b	b														
	0.04	b	b	b	b	b	a	a	b	b													
	0.08	b	b	b	b	b	a	a	b	b	a												
	0.1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b											
	0.16	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a										
	0.3	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a									
EGM	0	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	b	b								
	0.02	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	b	b	a							
	0.04	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	b	b	a	a						
	0.08	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	b	b	a	a	a					
	0.1	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	b	b	a	a	a	a				
	0.16	b	b	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	b	b	b	b	a	a			
	0.3	b	b	a	a	a	a	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a		

a = no hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

b = hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

A partir de los inversos de la Velocidad y concentración de sustrato, se calcularon los parámetros cinéticos de especificidad K_m y la velocidad máxima para cada uno de los extractos enzimáticos (Tabla 6), utilizando el modelo de Lineweaver and Burk (Figura 20, Figura 21 y Figura 22).

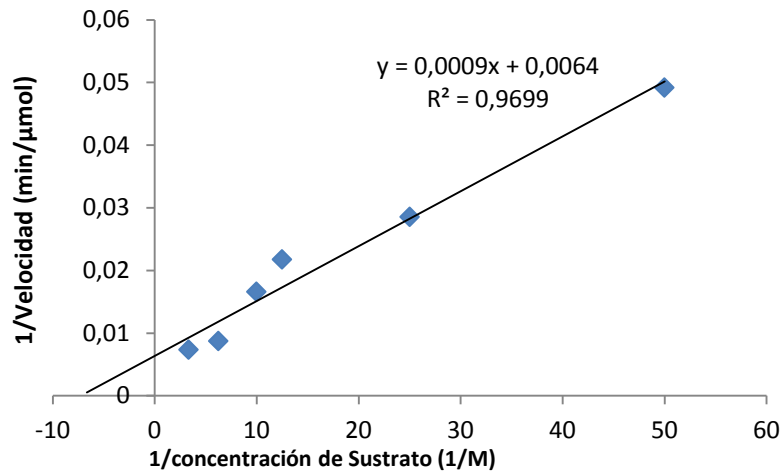


Figura 20. Determinación de K_m y V_{max} para la PFO presente en extractos de Borjón Maduro.

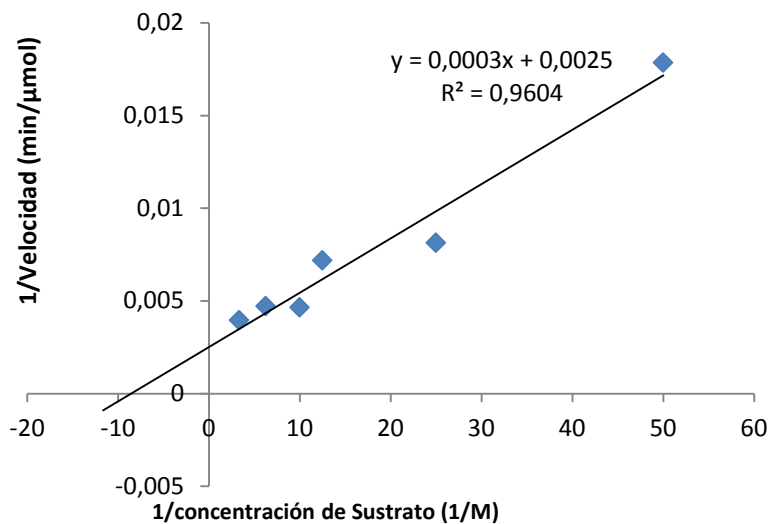


Figura 21. Determinación de K_m y V_{max} para la PFO presente en extractos de Borjón Verde.

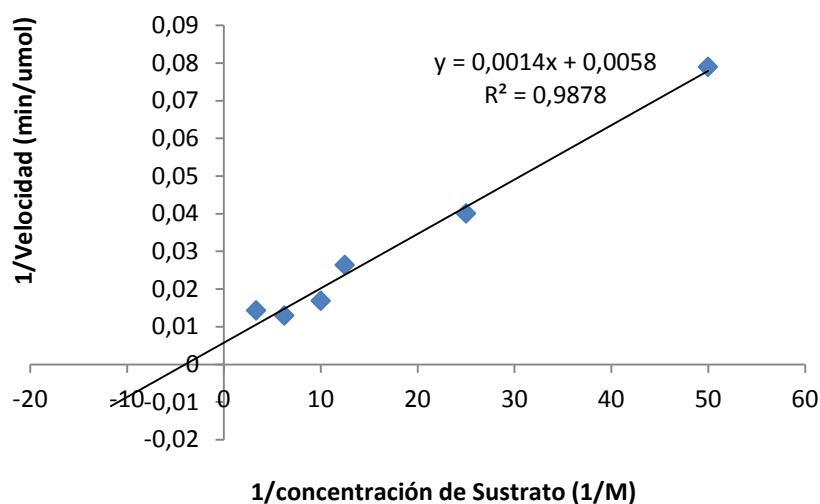


Figura 22. Determinación de K_m y V_{max} para la PFO presente en extractos Gel de Borojón Maduro.

Se obtuvo una alta actividad de la enzima PFO obtenida a partir de extractos de Borojón con el sustrato catecol, especialmente en EAV, para el cual se obtuvo un valor de V_{max} de $13333.33 \text{ U/mL} \cdot \text{min}$, mientras que para los dos extractos de Borojón maduro EAM y EGM se obtuvieron valores de V_{max} de 5208.33 y $5747.13 \text{ U/mL} \cdot \text{min}$ respectivamente (Tabla 6). Los valores de K_m obtenidos fueron de 0.15 M para EAM, 0.24 M para EGM y 0.12 M para EAV. De ésta enzima se han reportado valores de V_{max} desde 4260 a $11700 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ para la habichuela (80), $4081 \pm 8 \text{ U}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ en la lechuga (71) y 218 U/mg proteína en Latex del mango (96) utilizando catecol como sustrato, valores comparables con los obtenidos durante este trabajo.

Tabla 5. Constantes cinéticas obtenidas para las preparaciones de extracto enzimático PFO de frutos de Borojón en dos estados de maduración.

	Extracto		
	EAM	EGM	EAV
V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	156.25	172.41	400.00
V_{max} ($\text{U}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	5208.33	5747.13	13333.33
V_{max} ($\text{U}/\text{min} \cdot \text{mg}$)	531.63	668.31	1139.89
K_m (M)	0.15	0.24	0.12

3.4.6.4 Evaluación Preliminar De Los Perfiles Proteicos Por Electroforesis SDS-PAGE

Con base en los perfiles electroforéticos obtenidos en geles teñidos con azul de Coomassie, utilizando un marcador molecular Invitrogen ® 10–190 kDa se visualizó la formación de tres bandas, más notorias en el extracto de Borjón Verde liofilizado (EAVL), en donde se podría encontrar la PFO o alguna de sus iso – enzimas (97). Se determinó el peso correspondiente a esas tres bandas, los cuales correspondieron a 20, 42 y 50 a 53 kDa (Figura 23). Varios autores han reportado pesos de ésta enzima entre 25 - 67 kDa (84) (74), indicando que una de éstas bandas podría ser la correspondiente a la enzima y a algunos conformeros de la misma, por ésta razón sería recomendable el realizar una identificación in situ de la misma (98).

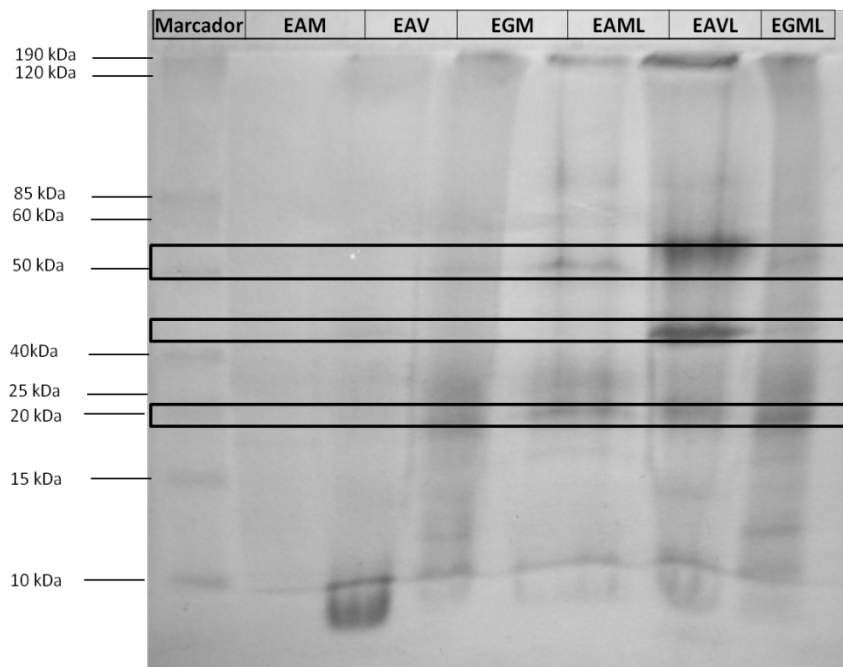


Figura 23. Electroforegrama para cada una de las fases de extracción.

3.5 CONCLUSIONES

Este primer estudio sobre la enzima polifenoloxidasasa en extractos de Borjón en dos estados de maduración evidenció la presencia de la enzima PFO en el fruto;

se observó su comportamiento a diferentes pH's y temperaturas dentro de los rangos reportados en otros frutos, encontrándose una mayor actividad en las pruebas realizadas con el Borojó verde, lo cual indica el potencial del Borojó en estados tempranos de maduración y la importancia de estudiar las condiciones de almacenamiento con el fin de disminuir la actividad de las PFO's y aumentar la vida útil de este fruto.

4. CAPITULO IV: ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA HIALURONIDASA A PARTIR DE EXTRACTOS DE BOROJO

4.1 RESUMEN

Las hialuronidasas son enzimas ampliamente distribuidas en el reino animal, y que han sido objetivo de estudio debido a su alta selectividad en la hidrólisis del ácido Hialurónico, polisacárido hallado en la matriz extracelular de tejidos animales e importante en la estabilidad estructural del mismo. La capacidad antioxidante de los polifenoles relacionada directamente con su contenido y el tipo de polifenoles presentes en diferentes tejidos vegetales ha sido una de las hipótesis investigadas para explicar el posible efecto antiinflamatorio de extractos de origen vegetal y su participación en la actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa. El Borojó (*Borojoa patinoi cuatrec*) es un fruto con alto contenido de polifenoles, y ha sido utilizado tradicionalmente como antiinflamatorio, energizante y cicatrizante en regiones de la región pacífica Colombiana, por lo cual este estudio tuvo como objetivo evaluar y comparar la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la hialuronidasa. El ensayo se realizó utilizando como sustrato hialuronato de sodio y como inhibidores extractos polifenólicos a diferentes concentraciones (v/v) obtenidos de frutos de Borojó en dos estados de maduración, en donde se obtuvo una mayor inhibición por parte de los extractos derivados del Borojó en estado verde en las diferentes concentraciones utilizadas. Ésta investigación remarca la necesidad de investigar a detalle los principios bio - activos de los compuestos polifenólicos en el Borojó, y enseña el uso potencial de estos en las industrias alimenticias, cosméticas y farmacéuticas.

Palabras clave: *Hialuronidasa, inhibición, Borojó, polifenoles.*

4.2 INTRODUCCION

La enzima hialuronidasa es una glucosidasa de la familia de las mucopolisacaridasas de interés industrial por la degradación del ácido hialurónico, el cual es un polisacárido del tipo glucosaminoglucano de alto peso molecular presente en la matriz extracelular de tejidos animales, compuesto de unidades

disacáridas de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (Figura 24), el cual se encuentra especialmente en los tejidos conectivos suaves (99). Comúnmente el ácido hialurónico es conocido como responsable de las propiedades visco elásticas de los tejidos, además de componente hidratante de los mismos (100).

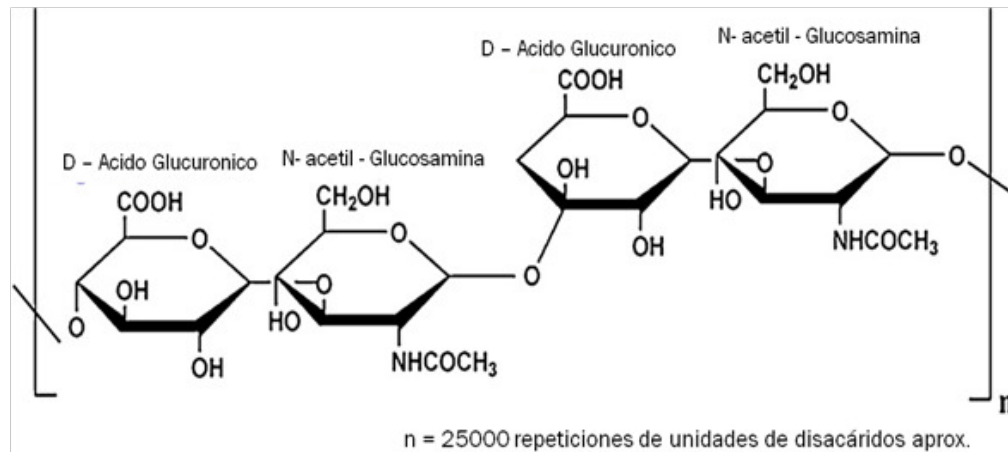


Figura 24. Estructura del ácido Hialurónico (100).

La hidrolización del ácido hialurónico tiene varios efectos: la generación de una amplia gama de oligosacáridos angiogénicos molecularmente bioactivos con propiedades pro-inflamatorias e inmunoestimulantes y, deterioro en la capacidad de almacenamiento de la matriz extracelular, la cual contiene iones metálicos, factores de crecimiento, citoquinas y diferentes enzimas para la transducción de señales. Por lo cual necesita ser protegido de la degradación prematura causada por la enzima hialuronidasa (101) (17).

El potencial de los agentes inhibidores de la enzima hialuronidasa puede ser evaluado en la capacidad de mantener la estructura del ácido Hialurónico, lo que implicaría servir como agentes anti-inflamatorios, anti-envejecimiento, anti-microbiano, contra el cáncer y anti-venenos/toxinas y anticonceptivos (101) (102). El estudio de las interacciones de compuestos de bajo peso molecular como los polifenoles en reacciones enzimáticas ha adquirido mayor relevancia por ser uno de los mecanismos con los cuales se podría explicar diferentes propiedades atribuidas a extractos vegetales ricos en compuestos de este tipo (103). El

importante contenido de polifenoles del Boroj6 (2), podr6a ser de importancia para la actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa (20), se ha evaluado la capacidad inhibitoria de 6sta enzima por medio de los fenoles presentes en la fresa (13) y la mora (*Rubus fruticosus B.*) (21), estudios elaborados con polifenoles del grupo de los galatos de alquilo reportaron mayor actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa utilizando reactivos fen6licos de mayor peso molecular (104). Por otro lado, en extractos de la hoja de *Eucalyptus globulus*, se ha encontrado actividad inhibitoria de enzimas, como la hialuronidasa y tirosinasa debido a sus compuestos fen6licos (22), en *Caesalpinia paraguariensis* se hallaron fracciones inhibitorias entre las que se encuentran compuestos del tipo antocianidina (105), adem6s se ha reportado que la inhibici6n de la Hialuronidasa por flavonoides depende del n6mero de grupos hidroxilo presentes en su estructura, adem6s del tipo de hialuronidasa a inhibir, siendo la inhibici6n por triterpenos y flavonoides presumiblemente espec6fica para cada relaci6n 6cido hialur6nico (HA)-escisi6n enzim6tica (106). La capacidad de inhibici6n de la enzima hialuronidasa puede ser 6til en la industria alimenticia y cosm6tica no antioxidante, por su efecto contra la melanog6nesis, anti-alergia y la inflamaci6n (92) (22). Estos estudios demuestran el inter6s en el desarrollo de productos fito terap6uticos, que sustituyan la utilizaci6n de los f6rmacos actuales.

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Material Vegetal

El fruto del Boroj6 (*Borojoa patinoi cuatrec*) en estado previo a su cosecha y maduro fue adquirido de proveedores locales en la ciudad de Villavicencio. De forma manual se removieron las semillas de la fruta, para obtener la pulpa la cual se almacen6 en bolsas de polietileno de baja densidad con banda herm6tica abre-cierre (Ziploc®) a una temperatura de 4 6C hasta su utilizaci6n.

4.3.2 Reactivos Qu6micos

Para la preparación de soluciones y buffers así como para las mezclas de reacción durante las mediciones espectrofotométricas fue utilizada agua destilada junto con los siguientes químicos y reactivos de grado analítico:

Hialuronato de Sodio de cresta de gallo, Hialuronidasa de testículos bovinos (EC 3.2.1.35), Cloruro de Sodio (NaCl), Ácido acético, Acetato de Sodio y Ácido gálico (Sigma Aldrich ® G7384 – 100G) fueron adquiridos de la marca Sigma Aldrich Chem. Co. ®.

Hidróxido de Sodio (NaOH), Albúmina fracción V de suero Bovino, Reactivo de Folin–Ciocalteu, Fosfato Di-sódico Anhidro (Na₂HPO₄), y el etanol al 96% v/v fueron adquiridos de la marca Merck A.G ®, y fosfato mono potásico (KH₂PO₄) Carlo Erba ®.

4.3.3 Obtención de extractos polifenólicos.

Los extractos obtenidos a partir de los frutos fueron preparados de acuerdo al protocolo descrito por Sotelo y Col. (2), con algunas modificaciones, para lo cual se empleó etanol al 70% en una relación 1:6 (peso pulpa fresca (g)/vol. solvente (mL)) la mezcla fue homogenizada por 30 minutos con un Ultra-Turrax T25 Junke & Kunkel IKA® - Labortechnik (Staufen – Alemania). El homogenizado fue almacenado a 4 °C durante 24 horas alejado de la luz, para luego ser filtrado a través de seis capas de gasa. Los extractos fueron concentrados por destilación a presión reducida en un evaporador rotativo Heidolph, Hei – Vap value (Schwabach – Alemania) a una temperatura de 40 °C y una presión de vacío de 131 mmHg; Obteniendo extractos etanólicos de Borojó Verde (EEVR) y Maduro concentrados (EEMR).

4.3.4 Cuantificación de polifenoles.

Se cuantificó el contenido de polifenoles presentes en los extractos concentrados por el método de Folin- Ciocalteu (86). Por triplicado en un balón aforado de 25 mL se adicionó 1 mL de extracto, 5 mL de agua destilada y 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos de reacción, se adiciono 1 mL de

carbonato de sodio al 7% y se aforo a 25 mL con agua destilada; se dejó reaccionar por 90 minutos alejado de la luz. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo–Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

El contenido de polifenoles se expresó por medio de una curva de calibración estándar, en mg de ácido gálico (AG)/L de muestra (ANEXO 1).

4.3.5 Ensayo De La Actividad Hialuronidasa

La medición de la actividad hialuronidasa fue medida espectrofotométricamente por ensayos de reducción de turbidez basados en el método descrito por Duffman (107), con algunas modificaciones. La medición de la actividad enzimática se realizó variando los volúmenes de extracto enzimático en cada una de las ensayos de actividad; 20 µl de solución de Hialuronidasa (10 unidades) fue preparada en una solución enfriada (4 °C) de buffer fosfato 20 mM, pH 7, 77 mM de cloruro de sodio y 0.01% (p/v) de albumina de suero bovino; se agregaron diferentes volúmenes de extracto (10, 20, 30, 40 y 50 µl), y de buffer fosfato 20 mM anteriormente utilizado hasta completar un volumen de 100 µl en cada uno de los ensayos, la reacción de control (sin extracto enzimático) se completó con este mismo buffer añadiendo el volumen correspondiente, éstas soluciones fueron incubadas por un periodo de 10 minutos a 37 °C. Luego fueron mezcladas con 150 µl de solución 0.03 % (p/v) de ácido hialurónico e incubadas por un periodo de 45 minutos a 37 °C, 50 µl de ésta solución fueron mezclados con 250 µl de una solución 24 mM de acetato de sodio, 79 mM de ácido acético y 0.1 % (p/v) de albumina de suero bovino pH 3.75 a 37°C, ésta solución fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, después de esto se leyó su absorbancia ($A_{600\text{ nm}}$) en un lector de microplatos marca BIO –RAD iMarck™ (California – USA), una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que reduce la absorbancia en 0.1 a 600 nm (108), el % de inhibición fue definido como se describe en la siguiente expresión:

Calculo del % de inhibición de la actividad hialuronidasa por los extractos polifenólicos. (Ec. 3).

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Abs corregida muestra} - \text{blanco enzimatico}}{\text{Abs Control} - \text{blanco enzimatico}} \right) * 100$$

Trabajos previos realizados por el grupo de procesos agroindustriales de la Universidad de La Sabana, han reportado un contenido de Ácido Gálico de $445.5 \pm 38 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ en extractos acuosos de Borojé Maduro, por lo cual con el fin de realizar un análisis comparativo, se prepararon soluciones de ácido gálico con concentraciones equivalentes al contenido de polifenoles totales cuantificados en los extractos de Borojé Maduro (AGM) y Borojé Verde (AGV), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando como inhibidor los mismos volúmenes de las soluciones de ácido gálico preparadas.

4.3.6 Análisis Estadístico

Los datos fueron obtenidos por triplicado, expresados como el promedio \pm desviación estándar, las diferencias estadísticas fueron establecidas por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en los diferentes niveles de cada uno de los factores con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis se desarrollaron utilizando el software Minitab® para Windows versión 15.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.4.1 Cuantificación de Polifenoles

Para la cuantificación del contenido polifenoles de los extractos se obtuvieron valores de 1886.45 ± 185.49 y $648.82 \pm 248.46 \text{ mg eq-ácido gálico}/100\text{g fruto}$ como contenido fenólico para EEVR y EEMR respectivamente (Figura 25), además de los resultados publicados por Sotelo y colaboradores, resultados previos obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales en extractos acuosos de Borojé Verde y Maduro muestran un menor contenido de polifenoles totales entre 357.51 a $800 \text{ mg eq-ácido gálico}/100\text{g fruto}$ en el Borojé Maduro, mientras que en el Borojé Verde se obtuvo un contenido de $284.02 \pm 32.19 \text{ mg eq-ácido}$

gálico,/100g fruto, ésta diferencia se puede deber a una mayor solubilidad de polifenoles de mayor composición en etanol (91), A. López y colaboradores (2011), concluyeron en su estudio que el cambio de polaridad en el solvente utilizado en los procesos de extracción altera la capacidad de extraer diferentes grupos de compuestos fenólicos indicando una mayor solubilidad de polifenoles de bajo peso molecular en solventes polares (109), a lo cual el contenido de polifenoles totales será relativo a los polifenoles de mayor proporción en el sistema biológico de estudio que presenten mayor solubilidad en el solvente utilizado (110).

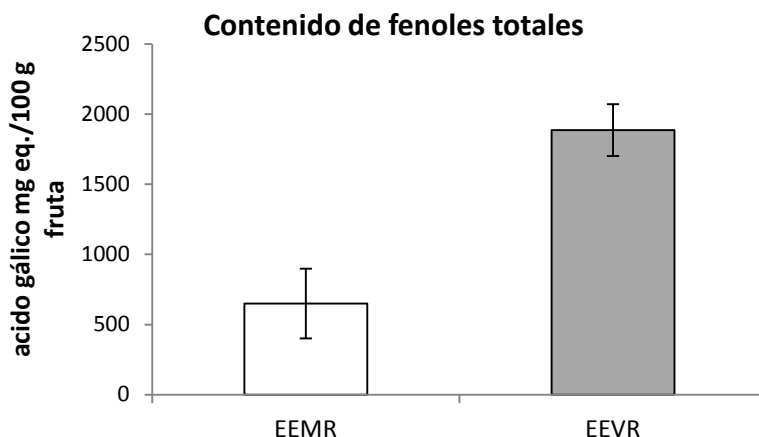


Figura 25. Cuantificación de fenoles totales en los extractos etanólicos.

4.4.2 Ensayo de la actividad Hialuronidasa

Se observó un comportamiento creciente en la inhibición de la enzima hialuronidasa en ambos extractos (Figura 26), pero con una mayor actividad inhibitoria por parte de EEVR, alcanzando un porcentaje de $44.48 \pm 8.05\%$ a una concentración de 25% (v/v), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los extractos utilizando concentraciones de 10% y a partir de 20% (v/v) (Tabla 7). Esto puede deberse principalmente a las diferencias en el contenido de polifenoles totales entre los frutos de Borjón (Figura 25), los cuales decrecen por la acción de la enzima PFO (Ver capítulo 3), sin embargo también se deben tener en cuenta los posibles cambios estructurales en los polifenoles que se

llevan a cabo durante el proceso de maduración y que dan lugar a nuevos compuestos y nuevas funciones de los mismos (111).

Tabla 6. Prueba comparativa de los diferentes tratamientos por el método de Tukey al 95% de confianza para el efecto de la concentración de sustrato y grado de maduración. en la inhibición de la enzima Hialuronidasa (ANEXO 10).

	Conc. (% v/v)	AGM					AGV					EEMR					EEVR						
		5%	10%	15%	20%	25%	5%	10%	15%	20%	25%	5%	10%	15%	20%	25%	5%	10%	15%	20%	25%		
AGM	5%																						
	10%	a																					
	15%	a	a																				
	20%	a	a	a																			
	25%	a	b	b	a																		
AGV	5%	a	a	a	a	b																	
	10%	a	a	a	a	a	a																
	15%	a	a	a	a	b	a	a															
	20%	b	a	a	b	b	a	b	a														
	25%	a	b	b	a	a	b	a	b	b													
EEMR	5%	a	a	a	a	a	a	a	b	a													
	10%	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a											
	15%	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	a	a										
	20%	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	a	a	a									
	25%	b	a	a	b	b	a	b	a	a	b	b	b	a	a								
EEVR	5%	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	b							
	10%	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a						
	15%	b	a	a	b	b	a	b	a	a	b	b	b	a	a	a	b	a					
	20%	b	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b	b	b	b	b	a	b	b	a			
	25%	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b		

a = no hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.
 b = hay evidencia estadística suficiente para afirmar que hay diferencia entre los tratamientos.

Estudios llevados a cabo durante el proceso de maduración del Banano y otros frutos permitieron identificar que compuestos polifenólicos de bajo peso molecular no eran alterados durante la maduración, sin embargo polifenoles de mayor peso molecular y causantes de características astringentes en frutos pueden ser polimerizados (actividad PFO), volviéndose insolubles y ocasionando cambios en

el sabor, estructura y apariencia del fruto (112) (113). En trabajos realizados en la inhibición de la hialuronidasa con diferentes flavonoides se concluyó que la ausencia de grupos metoxilo y/o hidroxilo en C-3 y C-7 respectivamente (Figura 3), son determinantes en la capacidad inhibitoria de esta enzima que va desde 18% hasta 92% (114), lo cual sugeriría que durante el proceso de maduración del Borjón, además de la polimerización en catequinas de los polifenoles a causa de la enzima PFO lo cual es responsable de la perdida de polifenoles totales y el cambio de color en el fruto, podrían suceder procesos de desmetilación y deshidroxilación en los compuestos polifenólicos presentes en el Borjón Verde.

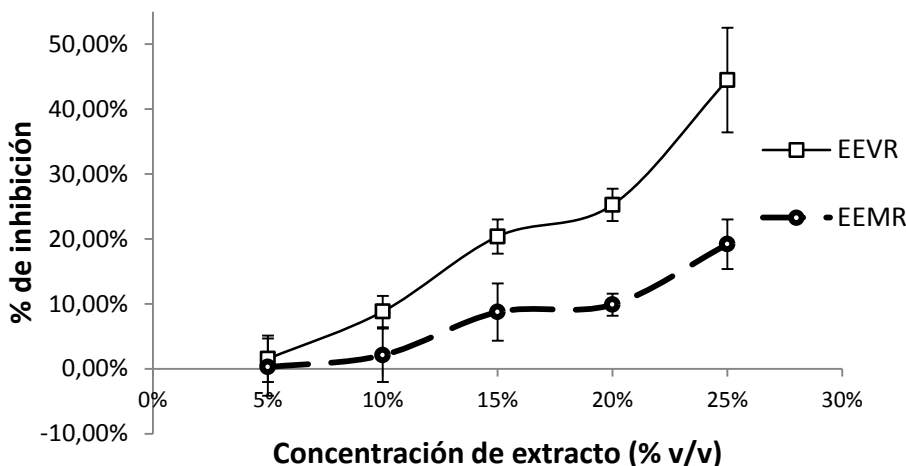


Figura 26. Inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando extractos etanólicos de Borjón.

Por otro lado, el porcentaje de inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando soluciones de ácido gálico con concentraciones promedio a las cuantificadas en el extracto etanólico de Borjón Verde y Maduro, mostraron comportamientos diferentes (Figura 27 y Figura 28), con intervalos de decrecimiento en el porcentaje de inhibición de la Hialuronidasa principalmente a mayores concentraciones de ácido gálico, lo que podría indicar un efecto inhibitorio más débil por parte de compuestos fenólicos aislados que en extractos vegetales ricos en diferente tipo de polifenoles (68), Sugimoto y Colaboradores, encontraron mayor capacidad inhibitoria de la Hialuronidasa en polifenoles de mayor

complejidad (elagitaninos y galotaninos), que en sus respectivas partes hidrolizables (agliconas) (22). Además, estudios realizados por el grupo de procesos agroindustriales de la Universidad de La Sabana encontraron en Borojó Maduro además de ácido Gálico, importantes cantidades de Rutina ($1393,87 \pm 84 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$), Resveratrol ($667.3 \pm 71 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$), Epicatequina ($334.8 \pm 71 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) y Catequina ($143.6 \pm 19 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$), polifenoles de mayor complejidad estructural y que probablemente actuarían sinérgicamente en la actividad inhibitoria de la Hialuronidasa.

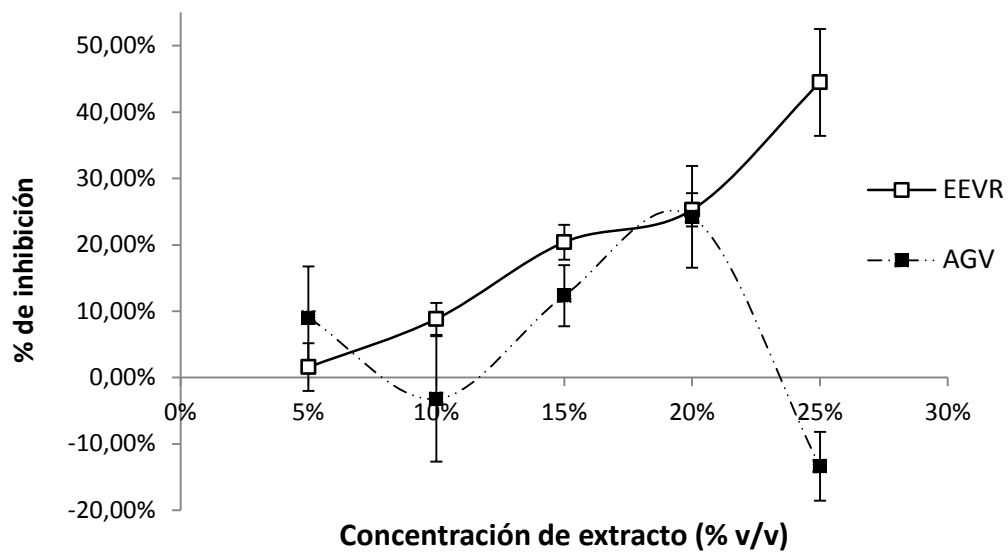


Figura 27. Comparativo de Inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando extractos etanólicos de Borojó Verde y ácido gálico.

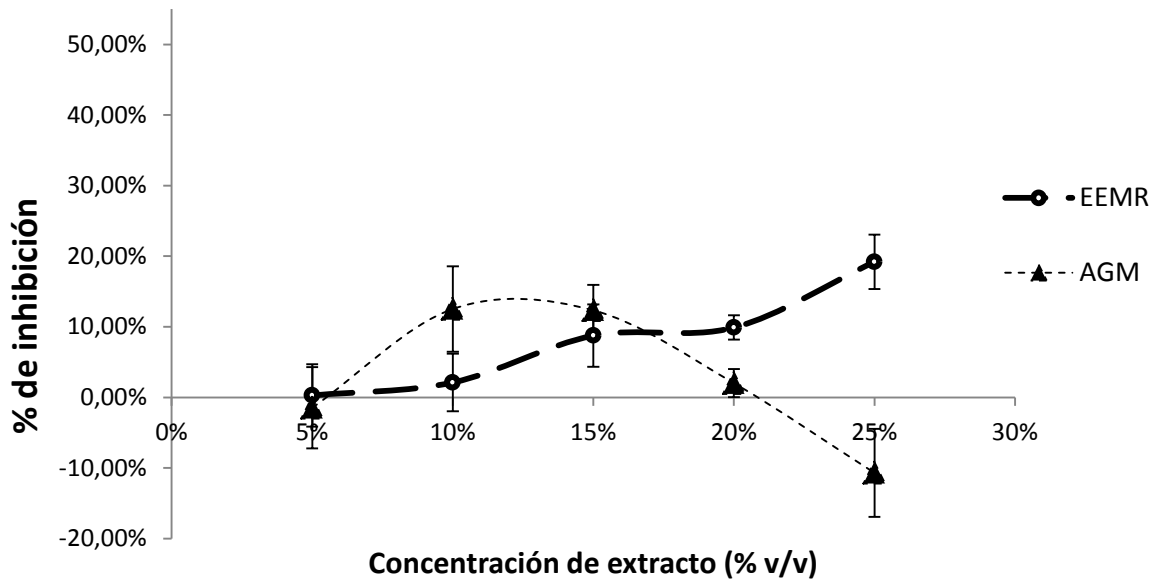


Figura 28. Comparativo de Inhibición de la enzima Hialuronidasa utilizando extractos etanólicos de Borjón Maduro y ácido gálico.

En la Figura 29, se observó el análisis para cada uno de los factores, en donde el efecto de la concentración de las soluciones y extractos utilizados presentó un comportamiento creciente en la inhibición de la actividad Hialuronidasa hasta concentraciones de 20% (v/v) y una disminución en la misma a concentraciones de 25% (v/v) ocasionada por los tratamientos con AGV y AGM, lo cual se determinó en el análisis comparativo de cada uno de los niveles de los factores estudiados (Tabla 7), presentando diferencias significativas entre AGV y AGM con EEMR y EEVR a esa concentración, en donde se pudo observar una mayor capacidad de inhibición en los extractos de Borjón, principalmente en el Borjón Verde (EEVR).

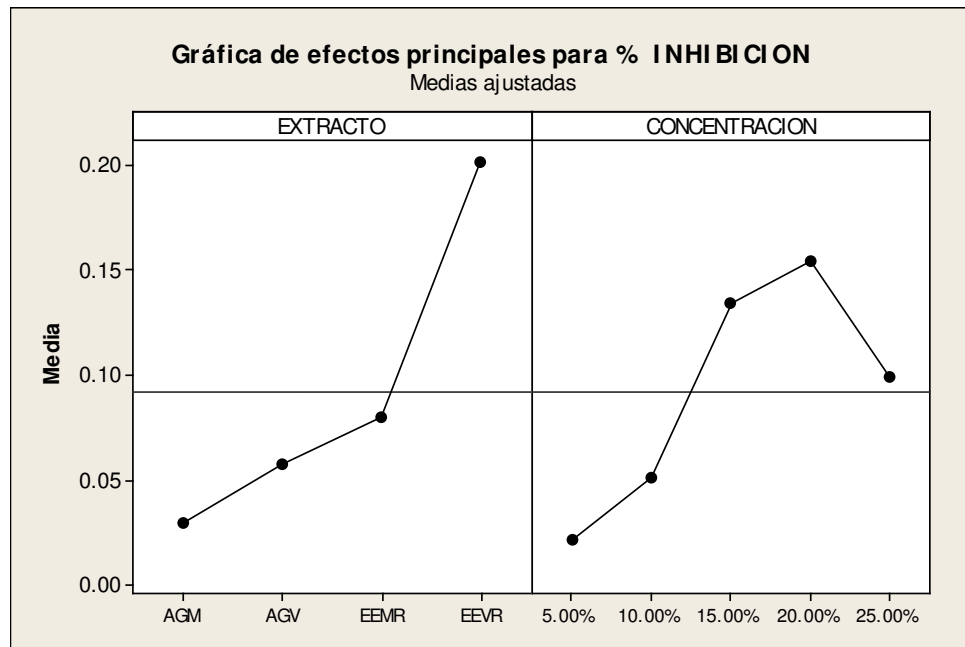


Figura 29. Gráfica de efectos principales en el porcentaje de inhibición de la enzima Hialuronidasa.

4.5 CONCLUSIONES

El presente estudio permitió evidenciar el potencial en la utilización de extractos de Borjón para la inhibición de enzimas de interés cosmético y farmacéutico como lo es la Hialuronidasa, hallándose mayor respuesta de inhibición de ésta enzima por parte de los extractos de Borjón Verde, obteniendo porcentajes de inhibición en la más alta concentración utilizada (25% v/v) de EEVR hasta del 40 %, hallando diferencias en la inhibición entre los extractos de Borjón en los dos estados de maduración utilizados, lo cual estaría relacionado con la diferencia hallada en el contenido de polifenoles totales entre los frutos, producida durante el proceso de maduración del mismo debido principalmente a la enzima polifenoloxidasas. Este proceso de maduración probablemente no solo influye en la cantidad, sino también en la posible desaparición y/o formación de polifenoles de diferente estructura y por lo tanto funcionalidad, lo que indica la necesidad de realizar análisis cromatográficos que permita identificar los posibles compuestos polifenólicos presentes en estados tempranos de madurez del fruto y que pudieran estar

interactuando con la enzima Hialuronidasa, sin embargo, con los resultados obtenidos con las soluciones de ácido Gálico, éste trabajo permitió concluir en un principio que el efecto de los polifenoles aislados es menor al efecto que ejercen sinérgicamente los polifenoles presentes en extractos de origen vegetal, que comparados con estudios realizados en otros productos de origen vegetal como la fresa, en donde se alcanzó un máximo de inhibición del 18,9%, inclusive mayor que antiinflamatorio no esteroideos como la aspirina en donde se logró inhibir la actividad de la hialuronidasa en un 17% (13), en Cardo Mariano (*Silybum marianum*), donde se alcanzó una actividad inhibitoria del 92% (17) y mora (*Rubus fruticosus B.*) llegando a un porcentaje de inhibición máximo de 45% (21), entre otros, indica importantes perspectivas en la utilización de extractos de Borjón en la inhibición de esta enzima, y la necesidad de continuar estudios en relación a este fruto que permitan el desarrollo futuro de productos naturales basados en el mismo.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo permitió evaluar el efecto de algunas modificaciones fisicoquímicas (pH, Temperatura y concentración de sustrato) y del grado de maduración del fruto en la actividad PFO y como de ésta depende el contenido de compuestos polifenólicos en los frutos, con el fin de dar herramientas de manejo almacenamiento y procesamiento de este fruto desde etapas tempranas de maduración que permitan disminuir la actividad de las PFO's y así conservar metabolitos secundarios de interés que normalmente durante el proceso de maduración desaparecen debido principalmente a éste grupo de enzimas, dando paso a otro tipo de compuestos de menor importancia en el fruto. Estos metabolitos secundarios, responsables de ciertas características en los frutos y que son producidos por agentes endógenos y exógenos han sido propósito de estudio en el desarrollo de productos funcionales, que sean capaces de interactuar con biomoléculas de interés, como son cierto tipo de enzimas, en este caso la Hialuronidasa, la inhibición de ésta enzima ha sido objetivo en la formulación de productos de tipo cosmético y farmacéutico, debido a la capacidad de esta enzima de hidrolizar el ácido hialurónico y hialuronatos presentes principalmente en tejidos conectivos suaves y a lo cual se le atribuyen diferentes patologías, entre ellas el cáncer.

En este estudio se obtuvo mayor respuesta de inhibición de la hialuronidasa por parte de los extractos de Borojó Verde, debido posiblemente a la presencia de polifenoles metoxilados e hidroxilados de mayor tamaño, los cuales durante el proceso de maduración posiblemente forman parte del proceso de oxidación llevado a cabo por las PFO's en el fruto, para lo cual análisis cromatográficos en etapas tempranas de maduración serían recomendables para la identificación de los mismos, que pudieran llevar al desarrollo de una base de datos de metabolitos secundarios presentes en el Borojó en diferentes estados de maduración que permita identificar tiempos óptimos de recolección del fruto con el fin de obtener la mayor cantidad de los mismos. También, se pudo concluir en un principio que los

extractos de origen vegetal presentan mejor comportamiento inhibitorio de la Hialuronidasa que los polifenoles aislados, posiblemente debido al efecto que ejercen sinérgicamente los diferentes compuestos polifenólicos presentes en los mismos, dando importantes perspectivas en el uso de extractos de Borojó en el desarrollo futuro de productos de tipo funcional basados en el mismo y la necesidad de continuar estudios en relación a este fruto que permitan dar mayor valor agregado a este fruto endémico colombiano.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Dimensión espacial de la pobreza en Colombia*. Pérez, G. J. Cartagena : Centro de estudios económicos regionales (CEER), 2005, págs. 2-51. ISSN 1692 - 3715.
2. *Borojón (borojoa patinoi): source of polyphenols with antimicrobial activity*. Sotelo, I., Casas, N. y Camelo, G. 3, 2010, Vitae, Vol. 17, págs. 329-336.
3. *Rubiaceae de Colombia. Guía ilustrada de géneros*. Mendoza, H., Ramírez, B. y Jiménez, L. C. Bogotá, Colombia : s.n., 2004, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, pág. 351.
4. *Determinación del sexo en Borojón (Borojoa patinoi Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares*. Giraldo, C., y otros, y otros. 2, 2004, Col Biotechnol, Vol. 6, págs. 9-14.
5. *Plantas útiles de Lagarto Cocha y Serranía de Churumbelo en el departamento de Putumayo*. Cárdenas, D., y otros, y otros. Bogotá : s.n., 2002, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI, pág. 40p.: il.
6. *Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojón (borojoa patinoi cuatrec.) powder*. Mosquera, L. H., Moraga, G. y Martínez-Navarrete, N. 1, 2010, Journal of Food Engineering, Vol. 97, págs. 72 – 78.
7. *Estudio de una fitoalexina de Borojoa Cuatrecasas*. Echeverri, F., y otros, y otros. 38, 1981, Actividades Biologicas, Vol. 10, págs. 112-117.
8. *Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el color, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de una bebida de Borojoa patinoi Cuatrecasas*. Camelo, G. A y Sotelo, L. I. 11, 2012, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Vol. 2, págs. 196 - 205. ISSN 0717 7917.
9. *Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de Borojón (Borojoa patinoi Cuatrec)*. Salamanca, Guillermo, Osorio, Mónica Patricia y Montoya, Leidy Marcela. 1, 2010, Revista Chilena de Nutricion, Vol. 37, págs. 87-96.
10. *Obtención de una materia prima con valor agregado mediante secado por aspersion a partir del fruto fresco de borojón (Borojoa patinoi Cuatrec.)*. Mosquera, L. H., Ríos, H. A. y Zapata, P. S. 23, 2005, Rev Inst Univ Tecnológica Chocó, Vol. 11, págs. 5–10.
11. *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. Havsteen, B. 2002, Pharmacology & Therapeutics, Vol. 96, págs. 67– 202.
12. *Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity*. Peterson J., Dwyer J. 12, 1998, Nutrition Research,, Vol. 18, págs. 1995-2018.1.
13. *Actividad anti-inflamatoria de la hialuronidasa por los polifenoles en la fruta de la fresa*. Pernía, T., Corao, G. M y Araujo, L. 4, 2004, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Vol. 3, págs. 73-76.

14. *Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals*. Arct J., Pytkowska K. 2008, Clinics in Dermatology, Vol. 26, págs. 347–357.
15. *Evaluación del potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos de pulpa de Borojó (Borojoa patinoi cuatrec.)*. Camelo, G., y otros, y otros. 2009, Alimentos Hoy, Vol. 18, págs. 6-D3.
16. *Biological functions of a synthetic compound, octadeca-9,12-dienyl-3,4,5- hydroxybenzoate, from gallic acid–linoleic acid ester*. Jang A., Lee N-Y, Lee B-D., Hoon Kim T., Ho Son J., Jeun An B., Jo C. 2009, Food Chemistry, Vol. 112, págs. 369-373.
17. *The Use of Natural Compounds and Botanicals in the Development of Anti-Aging Skin Care Products*. Angerhofer, C. K., Maes, D. y Giacomoni, P. U. 2009, Skin Aging Handbook, págs. 205-263.
18. Departamento Nacional de Planeación. *Objetivos de Desarrollo del Milenio*. [En línea] [Citado el: 17 de Febrero de 2011.] <http://www.dnp.gov.co/PortalWeb/Programas/Educaciónyculturasaludempleoy pobreza/PolíticasSocialesTransversales/ObjetivosdeDesarrollodelMilenio.aspx>.
19. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. *Objetivos del Milenio/Publicaciones y Documentos. Hacia una Colombia equitativa e incluyente*. [En línea] [Citado el: 17 de Febrero de 2011.] <http://www.pnud.org.co/sitio.shtml?apc=a-c020101--&x=18653>.
20. *Antioxidative, antihyaluronidase and antityrosinase activities of some constituents from the aerial part of Piper elongatum VAHL*. Masuoka, C., y otros, y otros. 2003, Food Science and Technology Research, Vol. 9, págs. 197-201.
21. *Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (Rubus fruticosus B.)*. Marquina, M. A., y otros, y otros. s.l. : 73, 2002, Fitoterapia, págs. 727–729.
22. *Hydrolyzable Tannins as Antioxidants in the Leaf Extract of Eucalyptus globulus Possessing Tyrosinase and Hyaluronidase Inhibitory Activities*. Sugimoto, K., y otros, y otros. 2009, Food Science and Technology Research, Vol. 15, págs. 331-336.
23. *Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits*. Patthamakanokporn, O., y otros, y otros. 2008, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 21, págs. 241–248.
24. *El consumo de manzanas contribuye a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción*. Palomo , I., y otros, y otros. 3, 2010, Revista chilena de nutrición, Vol. 37, págs. 377-385.
25. *Los flavonoides en la terapia cardiovascular*. Russo, R. O. y Sánchez, M. S. 1, 2006, Rev Costarricense de cardiología, Vol. 8.
26. *Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*. Castañeda , C., Ramos , LL. y Ibáñez , V. 1, 2008, Rev Horizonte Médico, Vol. 8, págs. 56 – 72.

27. *Modern Phytomedicine*. Ahmad, I, Aqil, F y Owais, M. [ed.] I. Ahmad, F. Aqil y M. Owais. s.l. : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, págs. 322-329.
28. *Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity*. Pietta P., Minoggio M., Bramati L. 2003, *Studies in natural products chemistry*, Vol. 28, págs. 257-312.
29. *Polyphenols and health: What compounds are involved?* Del Rio, D., y otros, y otros. 2010, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, Vol. 20, págs. 1-6.
30. *Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga Ecklonia cava on histamine release*. Le Q-T., Li Y., Qian Z-J., Kim M-M, Kim S-K. 2009, *Process Biochemistry*, Vol. 44, págs. 168–176.
31. *Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae*. Nwosu F., Morris J., Lund V., Stewart D., Ross H., McDougall G. 2011, *Food Chemistry*, Vol. 126, págs. 1006-1012.
32. *Tea polyphenols for health promotion*. Khan N., Mukhtar H. 2007, *Life Sciences*, Vol. 81, págs. 519-533.
33. *Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano*. González , M., y otros, y otros. 1, 2005, *Rev Fitotecnia Mexicana*, Vol. 30 , págs. 43 –49.
34. *Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales*. Pérez, G. y Martínez, G. 4, 2001, *Acta Farm. Bonaerense*, Vol. 20, págs. 297-306.
35. *Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology*. Erlund, I. 2004, *Nutrition Research*, Vol. 24, págs. 851–874.
36. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Martínez, S., y otros, y otros. 6, 2002, *Nutrición hospitalaria*, Vol. XVII, págs. 271-278.
37. *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Bravo , L. 1998, *Nutr Rev*, Vol. 56, págs. 317-33.
38. *Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants*. Silanikove, N., Perevolotsky, A. y Provenza, F. D. 2001, *Animal feed science and technology*, Vol. 91, págs. 69 - 81.
39. *Contenido de taninos, fósforo fítico y actividad de fitasas en el grano de 12 híbridos de sorgo granífero (Sorghum bicolor (L) Moench)*. Ojeda, A., y otros, y otros. 1, 2010, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 60, págs. 93-98. ISSN 0004-0622.
40. *Technical viability of tannins of four forest species of brazilian semi-arid region to skidder skins*. Paes, J. B., y otros, y otros. 4, 2006, *Ciência Florestal*, Santa Maria, Vol. 16, págs. 453-462. ISSN 0103-9954 .
41. *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. Naczki , M. y Shahidi , F. 5, 2006, *J Pharmaceut Biomed.*, Vol. 41, págs. 1523 –1542.

42. *Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia*. Palacios , N., Burtin , D. y Leech , M. 2, 2004, Rev Col Biotecnol., Vol. 4, págs. 67 – 77.
43. *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación*. Martínez, S. 2010. ISBN: 978-84-693-7843-4.
44. *Analysis of condensed tannins: a review*. Schofield, P., Mbugua, D. M. y Pell, A. N. 2001, Animal feed science and technology, Vol. 91, págs. 21 - 40.
45. *Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime*. Haslam, E. 2007, Phytochemistry, Vol. 68, págs. 2713–2721.
46. *Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time*. Lapornik , B., Prosek , M. y Golc, A. 2, 2005, J Food Eng, Vol. 71, págs. 214 – 222.
47. *Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods*. Faller, A. L. K. y Fialho, E. 2010, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 23, págs. 561–568.
48. *Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits*. Fu, L., y otros, y otros. 2011, Food Chemistry, Vol. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.079.
49. *Antioxidant capacity, phenolic content and Vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia*. Contreras Calderón, José, y otros, y otros. 2011, Food Research International, Vol. 44, págs. 2047-2053.
50. *Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents*. Alothman, M., Bhat, R. y Karim, A. 115, 2009, Food Chemistry, págs. 785–788.
51. *Antioxidan activity of fruits available in Aizawl market of Mizoram, India*. Ayub Ali, M., y otros, y otros. 2, 2010, International Journal of Biological & Pharmaceutical Research., Vol. 1, págs. 76-81.
52. *Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits*. Mertz, C., y otros, y otros. 22, 2009, Journal of Food Composition and Analysis, págs. 381–387.
53. *Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods*. Lako, J., y otros, y otros. 101, 2007, Food Chemistry, págs. 1727–1741.
54. *Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador*. Vasco, C., Ruales, J. y Kamal-Eldin, A. 2008, Food Chemistry, Vol. 111, págs. 816–823.
55. *Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. ‘Montgomery’ fruits*. Bystroma, L. M., y otros, y otros. 4, 2008, Food Chemistry, Vol. 111.
56. *Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil*. Almeida, M. M.B., y otros, y otros. 44, 2011, Food Research International, págs. 2155–2159.

57. *Bioactivity of flavonoids*. Robak, J. y Gryglewski, R. J. 6, 1996, *Pol J Pharmacol*, Vol. 48, págs. 555-64.
58. *Sirtuins: novel targets for metabolic disease*. Elliott, P. J. y Jirousek, M. 4, *Current Opinion in Investigational Drugs*, Vol. 9, págs. 371–8.
59. *POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CATEQUINAS DE Tachigali myrmecophyla (LEGUMINOSAE)*. Lôbo, Livia T., y otros, y otros. 3, 2008, *Quimica Nova*, Vol. 31, págs. 493-497.
60. *Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana)*. Zadernowski, R., Czapliski, S. y Naczki, M. 2009, *Food Chemistry*, Vol. 112, págs. 685–689.
61. *Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (Mangifera indica L.) varieties*. Ribeiro, S. M. R., y otros, y otros. 2008, *Food Chemistry*, Vol. 110, págs. 620–626.
62. *Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review*. O'Connell, J. E. y Fox, P. F. 2001, *International Dairy Journal*, Vol. 11, págs. 103–120.
63. *Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes*. Leighton, F., Urquiaga, I. y Diaz, M. S. 1997.
64. *Small-molecule inhibitors of the cancer target, isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, from Hovea parvicalyx*. Buchanan, Malcolm S., y otros, y otros. 2008, *Phytochemistry*, Vol. 69.
65. *La ruta RAS-ERK como diana antitumoral*. Crespo Baraja, Piero. 2009, Monografía XXIV. Redes de señalización y estrategias terapéuticas.
66. *Eventos de señalización asociados*. Morales Álvarez, L. y Ariza, M. 20, 2005, *Universitas Scientiarum*, Vol. 10, págs. 5-20.
67. *Efecto Antiproliferante Y Antifibrótico De La Fluvastatina En Células De Tumores Epiteliales: Implicaciones Terapéuticas Anticancerosas*. Núñez Lozano, Rebeca. Salamanca : s.n., 2011. Tesis Doctoral.
68. *Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals*. Arct, Jacek y Pytkowska, Katarzyna . 2008, *Clinics in Dermatology*, Vol. 26, págs. 347–357.
69. *Antioxidative and Antihyaluronidase Activities of Some Constituents from the Aerial Part of Daucus carota*. Ono, M., y otros, y otros. 2001, *Food Science and Technology Research*, Vol. 7 (4), págs. 307–310.
70. *Chondroprotective potential of fruit extracts of Phyllanthus emblica in osteoarthritis*. Sumantran, V. N., y otros, y otros. 2008, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 5, págs. 329-335.
71. *Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (Lactuca sativa var. capitata L.)*. Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U. y Swieca, M. 2008, *Food Chemistry*, Vol. 107, págs. 129-135.
72. *Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review*. Mayer, A. M. 2006, *Phytochemistry*, Vol. 67, págs. 2318–2331.

73. *Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano gros michel en diferentes estados de maduración*. García, C. L., y otros, y otros. 2, 2006, Vitae, Vol. 13, págs. 13-19.
74. *Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean*. Waliszewski, K. N., Marquez, O. y Pardo, V. T. 2009, Food Chemistry, Vol. 117, págs. 196-203.
75. *Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables*. Toivonen, P. M.A. y Brummell, D. A. 2008, Postharvest Biology and Technology, Vol. 48, págs. 1–14.
76. *Defensive Role of Tomato Polyphenol Oxidases against Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*) and Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*)*. Bhonwong, A., y otros, y otros. 2009, Journal of Chemical Ecology, Vol. 35, págs. 28–38.
77. *Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) florets*. Gawlik-Dzik, i, U., Szymanowska, U. y Baraniak, B. 2007, Food Chemistry, Vol. 105, págs. 1047-1053.
78. *Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid*. Jang, J. -H. y Moon, K. -D. 2011, Food Chemistry, Vol. 124, págs. 444-449.
79. *Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.)*. Kumar, V. B. A., Mohan, T. C. K. y Murugan, K. 2008, Food Chemistry, Vol. 110, págs. 328-333.
80. *The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.)*. Guo, L., y otros, y otros. 2009, Food Chemistry, Vol. 117, págs. 143-151.
81. *High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree*. Terefe, N. S., y otros, y otros. 2010, Innovative Food Science & Emerging Technologies, Vol. 11, págs. 52-60.
82. *Efecto del cultivar y distancia entre plantas sobre características físicoquímicas del fruto del melón (*Cucumis melo* L.)*. García, J. C., y otros, y otros. 2, 2009, Rev. Fac. Agron., Vol. 26, págs. 141-158. ISSN 0378-7818.
83. *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*. Association of Official Analytical Chemists. 1990.
84. *Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening*. Ayaz, F., y otros, y otros. 2008, Food Chemistry, Vol. 106, págs. 291–298.
85. *A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae)*. Ozen, A., y otros, y otros. 2004, Food Chemistry, Vol. 85, págs. 431–437.
86. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstenic acid reagents*. Singleton, V y Rossi, J. 3, 1965, Amer. J. Enol. Viticult., Vol. 16, págs. 144-158.

87. *Quantitation of protein*. Stoscheck, C. 182, 1990, *Methods in Enzymology*, págs. 50-69.
88. *Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (Anacardium occidentale, L.) after processing*. Queiroz, C., y otros, y otros. 2011, *Food Chemistry*, Vol. 125, págs. 128–132.
89. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Laemmli, U. K. 1970, *Nature*, Vol. 227, págs. 680–685.
90. *Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (Eriobotrya japonica cv. Algerie): enzimología y fisiología de las polifenol oxidasas*. Sellés, S. M. Alicante : NA., 2007.
91. *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación*. Arranz Martínez, Sara . Madrid : s.n., 2010. ISBN: 978-84-693-7843-4.
92. *Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations*. Orak, H. H. 2007, *Scientia Horticulturae*, Vol. 111, págs. 235-241.
93. *Frutales tropicales para el piedemonte*. Orduz, J. y Rangel, J. [ed.] Programa Regional de Transferencia de Tecnología Cesar Augusto Jaramillo Salazar. 2002.
94. *Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless)*. Fortea, M., y otros, y otros. 2009, *Food Chemistry*, Vol. 113, págs. 1008-1014.
95. *Isolation and partial characterization of phenol oxidases from Mangifera indica L. sap (latex)*. Saby, John K., Bhat, S. G. y Prasada Rao, U.S.J. 68, 2011, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, págs. 30–36.
96. —. Saby John, K., Bhat, S. G. y Prasada Rao, U. J. S . 2011, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 60, págs. 30–36.
97. *Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate ("Lycopersicon esculentum" M.). Implicación de polifenol oxidasa (PFO) y enzimas antioxidantes*. Casado Vela, Juan . Alicante : Tesis Doctoral, 2004.
98. *Gel electrophoresis of polyphenol oxidase with instant identification by in situ blotting*. Cheng, T-M, y otros, y otros. 849, 2007, *Journal of Chromatography B*, págs. 331–336.
99. *Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity*. Ikegami-Kawai, M. y Takahashi, T. 2002, *Analytical Biochemistry*, Vol. 311, págs. 157-165.
100. *Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives*. El-Safory, N. S., Fazary, A. E. y Lee, C. K. 2010, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 81, págs. 165-181.
101. *Hyaluronidase inhibitors: A biological and therapeutic perspective*. Girish, K. S., y otros, y otros. 18, 2009, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 16, págs. 2261-2288.

102. *Antihyaluronidase Action of Ellagic Acid Effectively Prevents Polyspermy As a Result of Suppression of the Acrosome Reaction Induced by Sperm-Zona Interaction During In Vitro Fertilization of Porcine Oocytes*. Tokeshi, Isao, y otros, y otros. 4, 2007, Journal of Reproduction and Development, Vol. 53, págs. 755–764.
103. *Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant Laguncularia racemosa*. Shi, Cui , y otros, y otros. 2010, Phytochemistry, Vol. 71, págs. 435–442.
104. *Inhibitive Effects of Alkyl Gallates on Hyaluronidase and Collagenase*. Barla, F., y otros, y otros. 10, 2009, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 73, págs. 2335–2337.
105. *Actividad Inhibitoria de Hialuronidasa en extractos de Caesalpinia paraguariensis (D. PARODI) BURK. (Fabaceae)*. Sgariglia, Melina A., y otros, y otros. 5, 2007, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Vol. 6, págs. 274-275.
106. *Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes*. Hertel, W, Peschel, G, Ozegowski, J.-H , Müller, P.-J. 6, 2006, Archiv der Pharmazie, Vol. 339, págs. 313-318.
107. *Muchopolysaccharidases*. Duffman, Albert. 1955, Methods in Enzymology, Vol. I, págs. 166-173.
108. *Optimization of physical and nutritional parameters for hyaluronidase production by Streptococcus mitis*. Sahoo, S., y otros, y otros. 5, 2008 , Indian Journal of Pharmaceutical sciences, Vol. 70, págs. 661-664.
109. *The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of Stypocaulon scoparium algae extracts*. López, Aroa, y otros, y otros. 125, 2011, Food Chemistry, págs. 1104–1109.
110. *Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables*. Sulaiman, Shaida Fariza, y otros, y otros. 4-5, 2011, Journal of Food Composition and Analysis , Vol. 24, págs. 506-515.
111. *The effect of ripening on the polyphenol profile of commonly consumed varieties of date palm fruits*. Eid, N., y otros, y otros. (OCE4), 2011, Proceedings of the Nutrition Society, Vol. 70, pág. E145.
112. *Change of Polyphenol Compounds in Banana Pulp during Ripening*. Mura , K. y Tanimura, W. 6, 2003, Food Preservation Science, Vol. 29, págs. 347-351.
113. *Changes of polyphenols, sugars, and organic acid in 5 Vitis genotypes during berry ripening*. Z., Liang, y otros, y otros. 9, 2011, Journal of Food Science, Vol. 76, págs. C1231–C1238.
114. *A hyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids*. Pessini, Andréa C., y otros, y otros. 2001, Toxicon, Vol. 39, págs. 1495-1504.

ANEXOS

ANEXO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO.

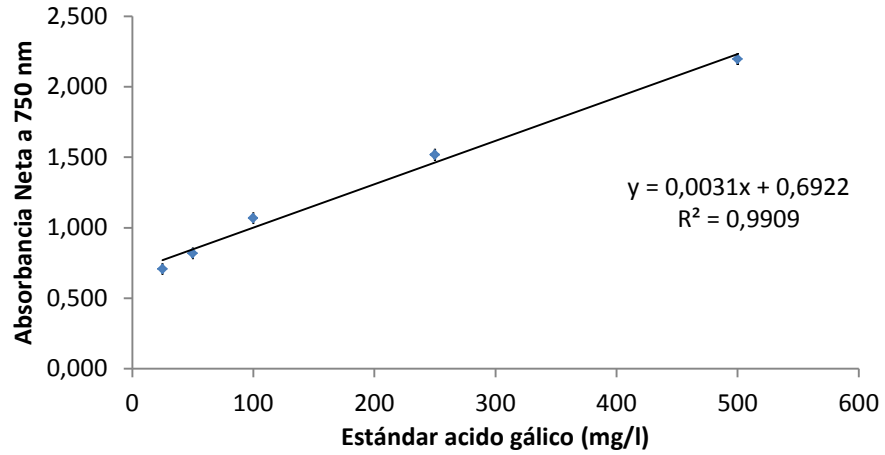


Figura 30. Grafica de calibración estándar de ácido gálico.

ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ALBUMINA DE SUERO BOVINO (BSA).

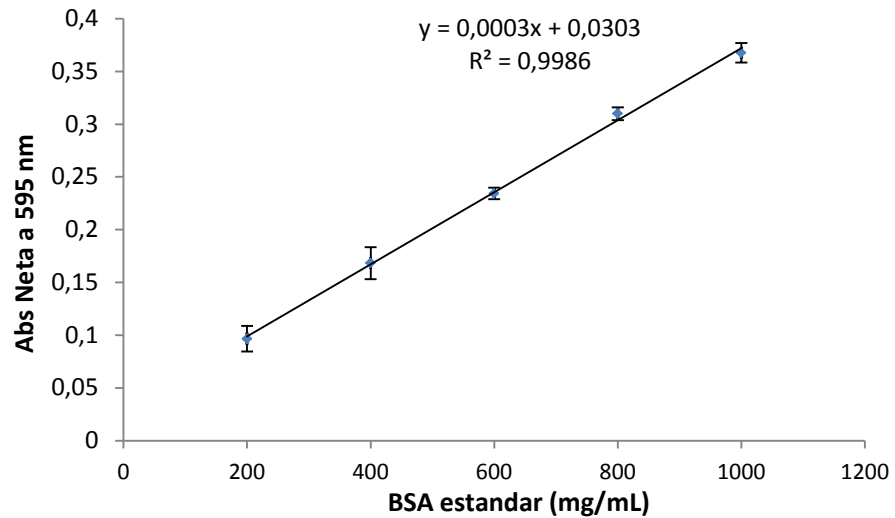


Figura 31. Grafica de calibración estándar de albumina de suero bovino (BSA).

ANEXO 3. BARRIDO ESPECTRAL DE SOLUCIONES DE CATECOL A DOS CONCENTRACIONES

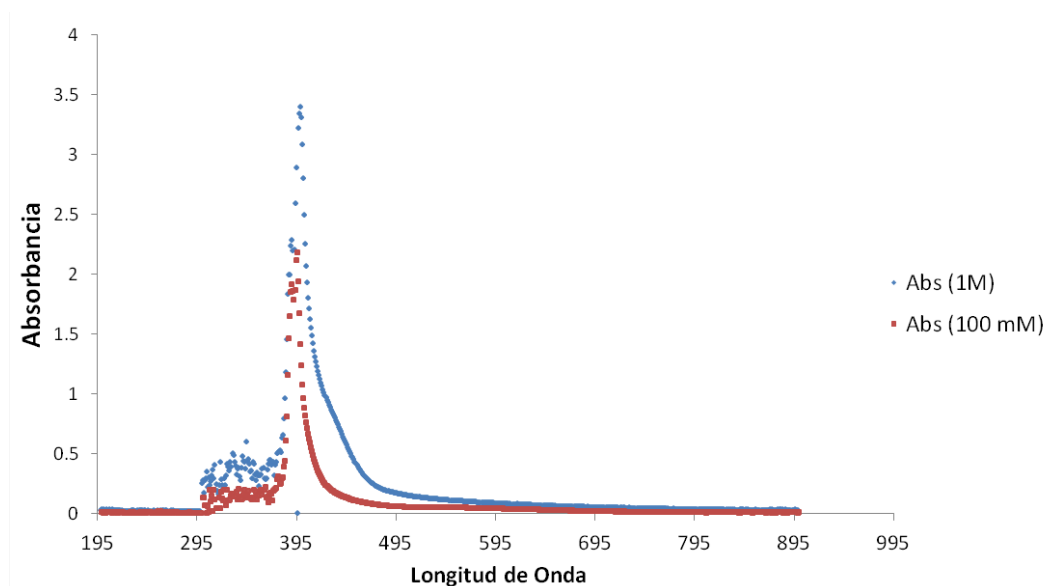


Figura 32. Barrido espectral de soluciones de catecol 1M y 100 mM.

ANEXO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN EXTRACTOS.

ANOVA unidireccional: POLIFENOLES vs. EXTRACTO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
EXTRACTO	2	73807	36904	90.27	0.000
Error	6	2453	409		
Total	8	76260			

S = 20.22 R-cuad. = 96.78% R-cuad. (ajustado) = 95.71%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
EAM	3	115.85	13.48
EAV	3	284.02	32.19
EGM	3	74.67	2.93

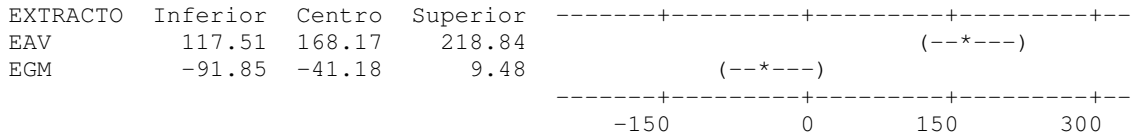
Desv.Est. agrupada = 20.22

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

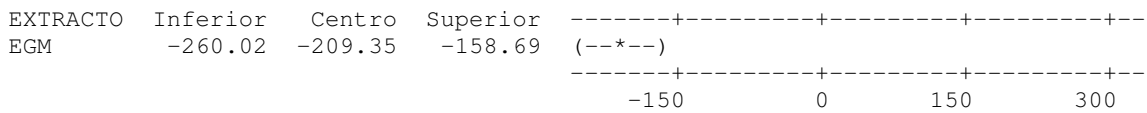
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de EXTRACTO

Nivel de confianza individual = 97.80%

EXTRACTO = EAM restado de:



EXTRACTO = EAV restado de:



ANEXO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONTENIDO PROTEICO EN LOS DIFERENTES EXTRACTOS.

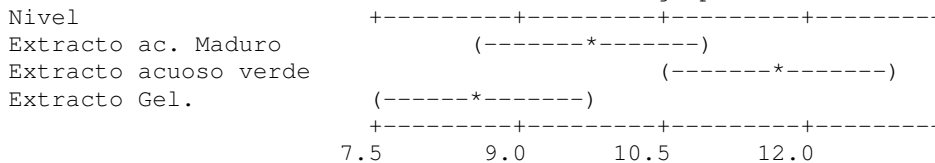
ANOVA unidireccional: Contenido proteico vs. Tipo de Extracto

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tipo de Extracto	2	19.52	9.76	9.08	0.007
Error	9	9.68	1.08		
Total	11	29.20			

S = 1.037 R-cuad. = 66.85% R-cuad. (ajustado) = 59.48%

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Extracto ac. Maduro	4	9.797	0.595
Extracto acuoso verde	4	11.697	0.709
Extracto Gel.	4	8.600	1.539

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada



Desv.Est. agrupada = 1.037

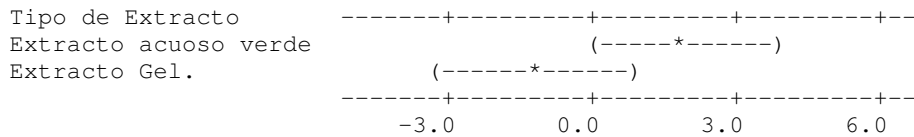
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo de Extracto

Nivel de confianza individual = 97.91%

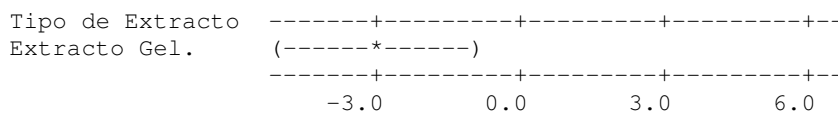
Tipo de Extracto = Extracto ac. Maduro restado de:

Tipo de Extracto	Inferior	Centro	Superior
Extracto acuoso verde	-0.148	1.900	3.948
Extracto Gel.	-3.246	-1.197	0.851



Tipo de Extracto = Extracto acuoso verde restado de:

Tipo de Extracto	Inferior	Centro	Superior
Extracto Gel.	-5.146	-3.098	-1.049



ANEXO 6. ANALISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DEL pH Y GRADO DE MADURACIÓN EN LA ACTIVIDAD PFO.

Modelo lineal general: Actividad Enzimática vs. Extracto, pH

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Extracto	fijo	3	EAM, EAV, EGM
pH	fijo	6	3.00, 4.00, 5.00, 6.20, 7.32, 8.13

Análisis de varianza para Actividad Enzimática, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Extracto	2	7730	7730	3865	4.21	0.023
pH	5	326834	326834	65367	71.21	0.000
Extracto*pH	10	109829	109829	10983	11.96	0.000
Error	36	33047	33047	918		
Total	53	477441				

S = 30.2981 R-cuad. = 93.08% R-cuad.(ajustado) = 89.81%

Observaciones inusuales de Actividad Enzimática

Obs	Actividad Enzimática	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
28	538.600	474.006	17.493	64.594	2.61 R
32	299.222	244.127	17.493	55.095	2.23 R
34	401.812	474.006	17.493	-72.193	-2.92 R
35	350.517	265.025	17.493	85.492	3.46 R

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95.0%

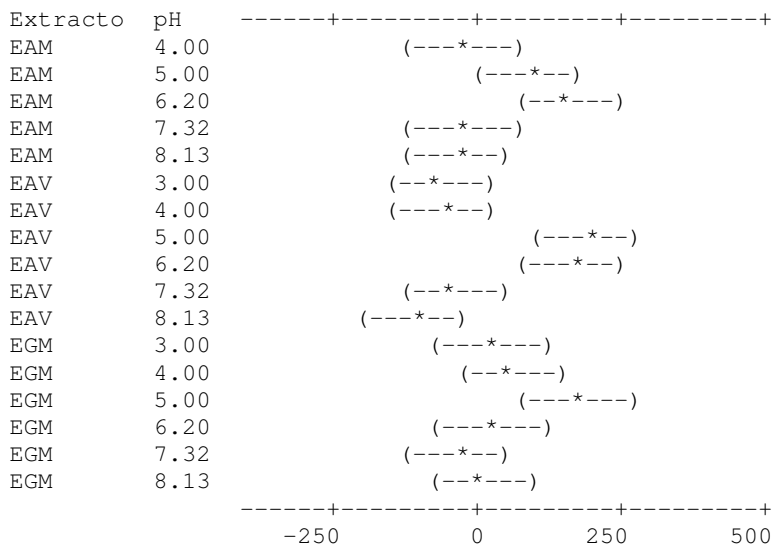
Variable de respuesta Actividad Enzimática

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Extracto*pH

Extracto = EAM

pH = 3.00 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAM	4.00	-119.9	-27.2	65.49
EAM	5.00	0.3	93.0	185.71
EAM	6.20	66.1	158.8	251.49
EAM	7.32	-122.2	-29.5	63.22
EAM	8.13	-124.5	-31.8	60.95
EAV	3.00	-161.3	-68.6	24.16
EAV	4.00	-153.7	-61.0	31.76
EAV	5.00	100.9	193.6	286.33
EAV	6.20	76.2	168.9	261.63
EAV	7.32	-132.8	-40.1	52.65
EAV	8.13	-201.2	-108.5	-15.74
EGM	3.00	-70.9	21.8	114.52
EGM	4.00	-32.1	60.6	153.28
EGM	5.00	86.7	179.4	272.15
EGM	6.20	-70.9	21.8	114.52
EGM	7.32	-127.8	-35.0	57.67
EGM	8.13	-81.2	11.5	104.18

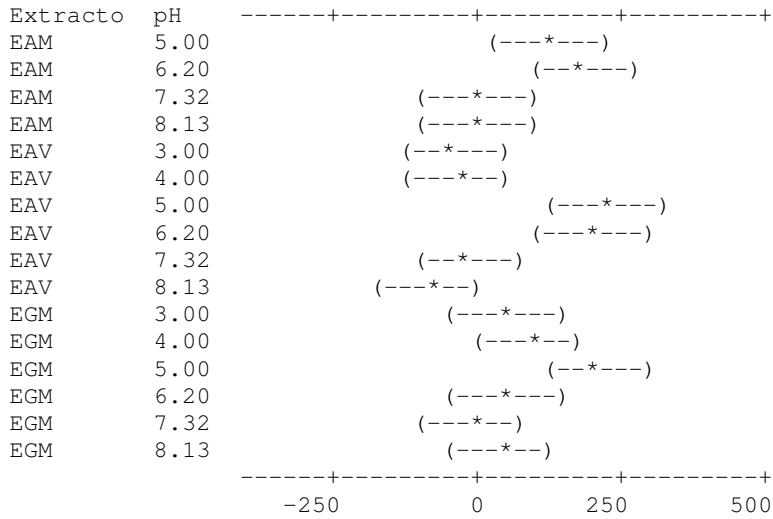


Extracto = EAM

pH = 4.00 restado a:

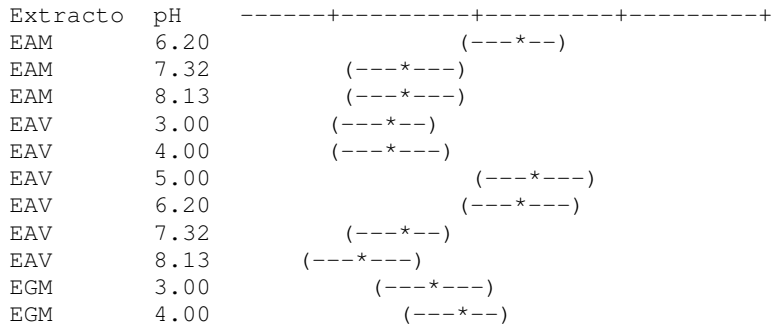
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAM	5.00	27.5	120.22	212.93
EAM	6.20	93.3	186.00	278.71
EAM	7.32	-95.0	-2.27	90.44
EAM	8.13	-97.2	-4.54	88.17
EAV	3.00	-134.0	-41.33	51.38
EAV	4.00	-126.4	-33.74	58.98
EAV	5.00	128.1	220.84	313.55
EAV	6.20	103.4	196.14	288.85
EAV	7.32	-105.5	-12.84	79.87
EAV	8.13	-173.9	-81.23	11.48

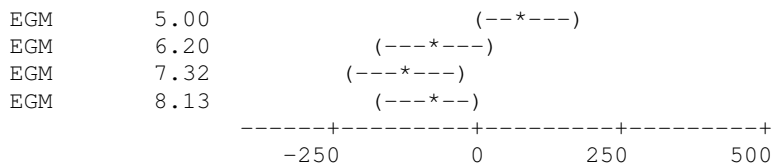
EGM	3.00	-43.7	49.03	141.74
EGM	4.00	-4.9	87.79	180.50
EGM	5.00	114.0	206.66	299.37
EGM	6.20	-43.7	49.03	141.74
EGM	7.32	-100.5	-7.82	84.89
EGM	8.13	-54.0	38.69	131.40



Extracto = EAM
pH = 5.00 restado a:

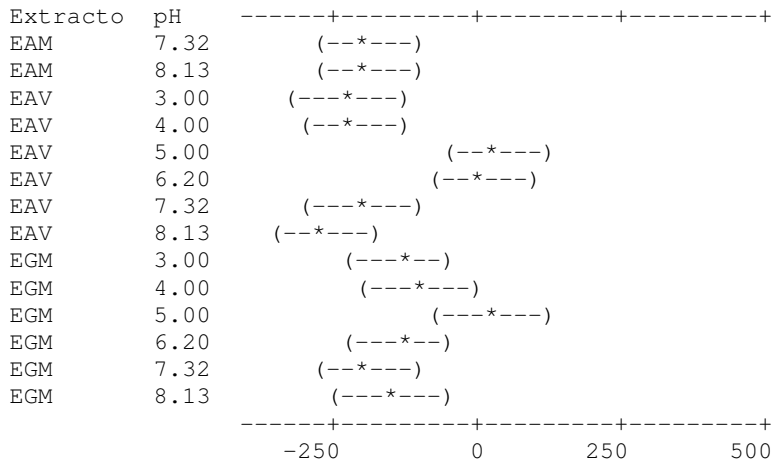
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAM	6.20	-26.9	65.8	158.5
EAM	7.32	-215.2	-122.5	-29.8
EAM	8.13	-217.5	-124.8	-32.0
EAV	3.00	-254.3	-161.6	-68.8
EAV	4.00	-246.7	-154.0	-61.2
EAV	5.00	7.9	100.6	193.3
EAV	6.20	-16.8	75.9	168.6
EAV	7.32	-225.8	-133.1	-40.3
EAV	8.13	-294.2	-201.4	-108.7
EGM	3.00	-163.9	-71.2	21.5
EGM	4.00	-125.1	-32.4	60.3
EGM	5.00	-6.3	86.4	179.2
EGM	6.20	-163.9	-71.2	21.5
EGM	7.32	-220.8	-128.0	-35.3
EGM	8.13	-174.2	-81.5	11.2





Extracto = EAM
 pH = 6.20 restado a:

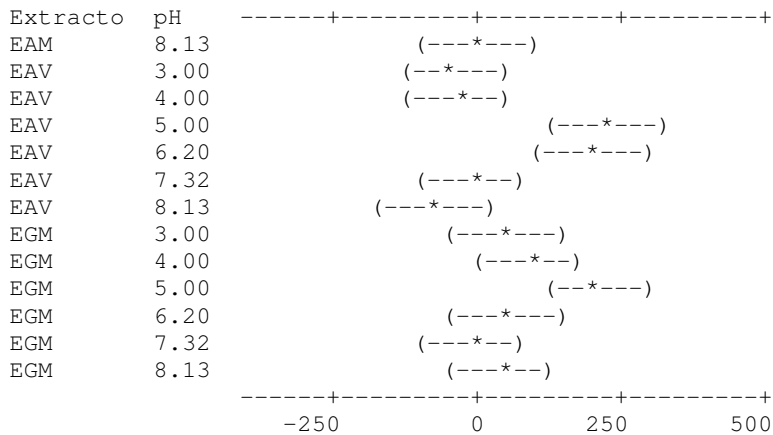
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAM	7.32	-281.0	-188.3	-95.6
EAM	8.13	-283.2	-190.5	-97.8
EAV	3.00	-320.0	-227.3	-134.6
EAV	4.00	-312.4	-219.7	-127.0
EAV	5.00	-57.9	34.8	127.6
EAV	6.20	-82.6	10.1	102.9
EAV	7.32	-291.5	-198.8	-106.1
EAV	8.13	-359.9	-267.2	-174.5
EGM	3.00	-229.7	-137.0	-44.3
EGM	4.00	-190.9	-98.2	-5.5
EGM	5.00	-72.0	20.7	113.4
EGM	6.20	-229.7	-137.0	-44.3
EGM	7.32	-286.5	-193.8	-101.1
EGM	8.13	-240.0	-147.3	-54.6



Extracto = EAM
 pH = 7.32 restado a:

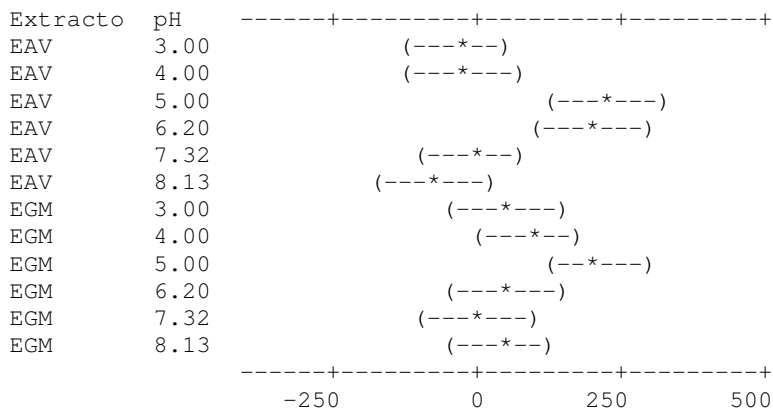
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAM	8.13	-95.0	-2.27	90.44
EAV	3.00	-131.8	-39.07	53.64
EAV	4.00	-124.2	-31.47	61.24
EAV	5.00	130.4	223.11	315.82
EAV	6.20	105.7	198.41	291.12
EAV	7.32	-103.3	-10.57	82.14
EAV	8.13	-171.7	-78.96	13.75
EGM	3.00	-41.4	51.30	144.01
EGM	4.00	-2.7	90.06	182.77
EGM	5.00	116.2	208.93	301.64

EGM	6.20	-41.4	51.30	144.01
EGM	7.32	-98.3	-5.55	87.16
EGM	8.13	-51.7	40.96	133.67



Extracto = EAM
pH = 8.13 restado a:

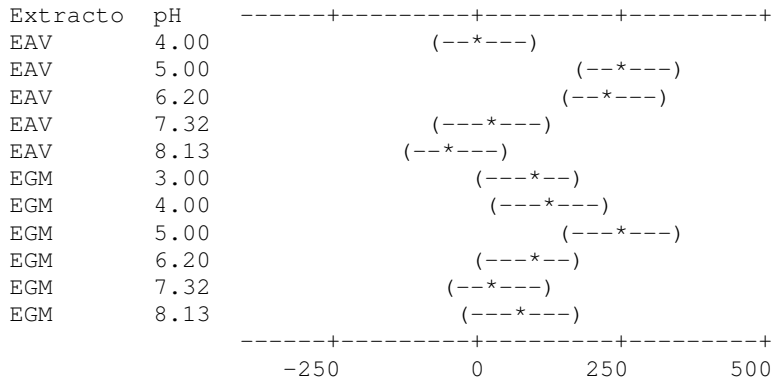
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAV	3.00	-129.5	-36.80	55.91
EAV	4.00	-121.9	-29.20	63.51
EAV	5.00	132.7	225.38	318.09
EAV	6.20	108.0	200.68	293.39
EAV	7.32	-101.0	-8.30	84.41
EAV	8.13	-169.4	-76.69	16.02
EGM	3.00	-39.1	53.57	146.28
EGM	4.00	-0.4	92.33	185.04
EGM	5.00	118.5	211.20	303.91
EGM	6.20	-39.1	53.57	146.28
EGM	7.32	-96.0	-3.28	89.43
EGM	8.13	-49.5	43.23	135.94



Extracto = EAV
pH = 3.00 restado a:

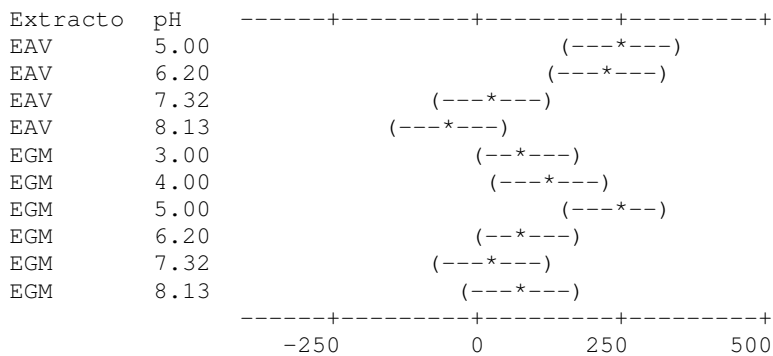
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
----------	----	----------	----------	----------

EAV	4.00	-85.1	7.60	100.31
EAV	5.00	169.5	262.18	354.89
EAV	6.20	144.8	237.48	330.19
EAV	7.32	-64.2	28.50	121.21
EAV	8.13	-132.6	-39.90	52.81
EGM	3.00	-2.3	90.36	183.08
EGM	4.00	36.4	129.13	221.84
EGM	5.00	155.3	248.00	340.71
EGM	6.20	-2.3	90.36	183.08
EGM	7.32	-59.2	33.51	126.22
EGM	8.13	-12.7	80.03	172.74



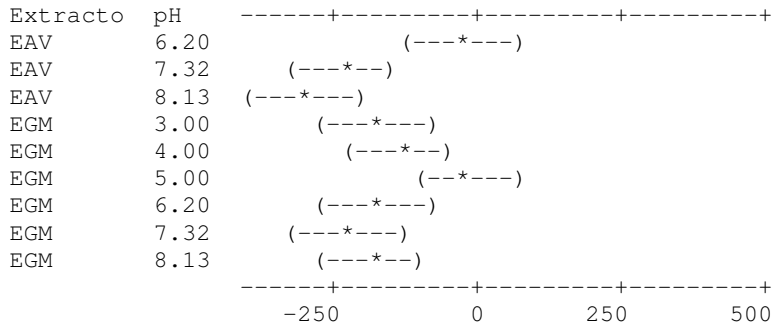
Extracto = EAV
pH = 4.00 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAV	5.00	161.9	254.58	347.29
EAV	6.20	137.2	229.88	322.59
EAV	7.32	-71.8	20.90	113.61
EAV	8.13	-140.2	-47.50	45.22
EGM	3.00	-9.9	82.77	175.48
EGM	4.00	28.8	121.53	214.24
EGM	5.00	147.7	240.40	333.11
EGM	6.20	-9.9	82.77	175.48
EGM	7.32	-66.8	25.91	118.63
EGM	8.13	-20.3	72.43	165.14



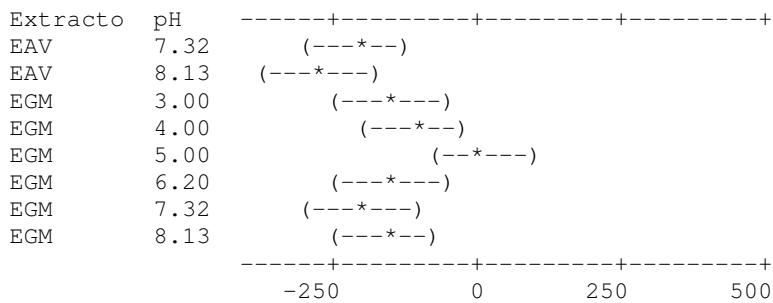
Extracto = EAV
pH = 5.00 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAV	6.20	-117.4	-24.7	68.0
EAV	7.32	-326.4	-233.7	-141.0
EAV	8.13	-394.8	-302.1	-209.4
EGM	3.00	-264.5	-171.8	-79.1
EGM	4.00	-225.8	-133.0	-40.3
EGM	5.00	-106.9	-14.2	78.5
EGM	6.20	-264.5	-171.8	-79.1
EGM	7.32	-321.4	-228.7	-136.0
EGM	8.13	-274.9	-182.1	-89.4



Extracto = EAV
pH = 6.20 restado a:

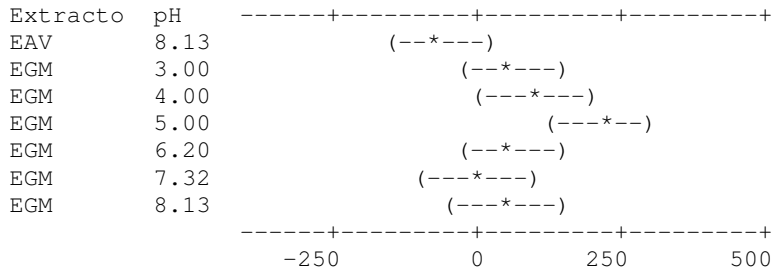
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAV	7.32	-301.7	-209.0	-116.3
EAV	8.13	-370.1	-277.4	-184.7
EGM	3.00	-239.8	-147.1	-54.4
EGM	4.00	-201.1	-108.4	-15.6
EGM	5.00	-82.2	10.5	103.2
EGM	6.20	-239.8	-147.1	-54.4
EGM	7.32	-296.7	-204.0	-111.3
EGM	8.13	-250.2	-157.4	-64.7



Extracto = EAV
pH = 7.32 restado a:

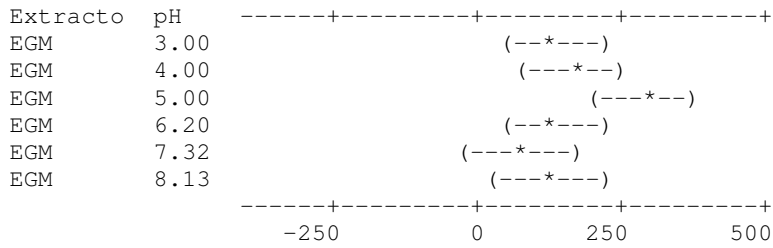
Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EAV	8.13	-161.1	-68.39	24.32
EGM	3.00	-30.8	61.87	154.58
EGM	4.00	7.9	100.63	193.34
EGM	5.00	126.8	219.50	312.21

EGM	6.20	-30.8	61.87	154.58
EGM	7.32	-87.7	5.02	97.73
EGM	8.13	-41.2	51.53	144.24



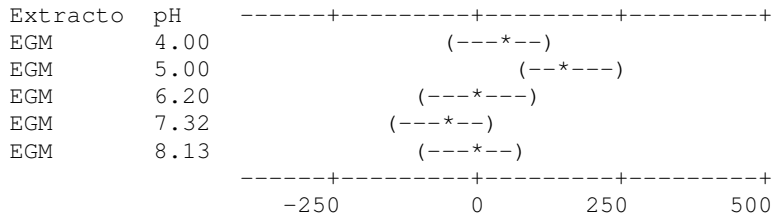
Extracto = EAV
 pH = 8.13 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EGM	3.00	37.55	130.26	223.0
EGM	4.00	76.31	169.02	261.7
EGM	5.00	195.18	287.89	380.6
EGM	6.20	37.55	130.26	223.0
EGM	7.32	-19.30	73.41	166.1
EGM	8.13	27.21	119.92	212.6



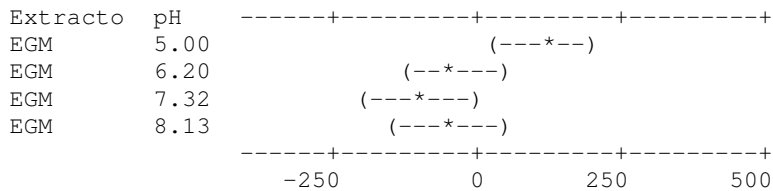
Extracto = EGM
 pH = 3.00 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EGM	4.00	-53.9	38.76	131.47
EGM	5.00	64.9	157.63	250.34
EGM	6.20	-92.7	0.00	92.71
EGM	7.32	-149.6	-56.85	35.86
EGM	8.13	-103.0	-10.34	82.37



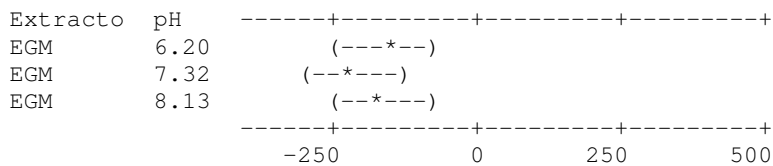
Extracto = EGM
 pH = 4.00 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EGM	5.00	26.2	118.87	211.581
EGM	6.20	-131.5	-38.76	53.949
EGM	7.32	-188.3	-95.61	-2.902
EGM	8.13	-141.8	-49.10	43.612



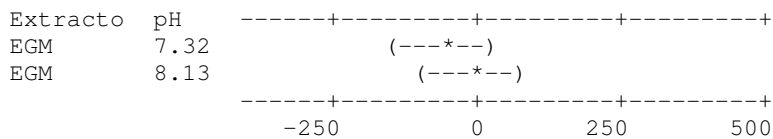
Extracto = EGM
pH = 5.00 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EGM	6.20	-250.3	-157.6	-64.9
EGM	7.32	-307.2	-214.5	-121.8
EGM	8.13	-260.7	-168.0	-75.3



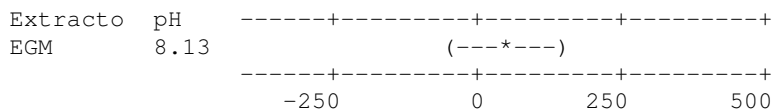
Extracto = EGM
pH = 6.20 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EGM	7.32	-149.6	-56.85	35.86
EGM	8.13	-103.0	-10.34	82.37



Extracto = EGM
pH = 7.32 restado a:

Extracto	pH	Inferior	Centrada	Superior
EGM	8.13	-46.20	46.51	139.2



Pruebas simultáneas de Tukey
Variable de respuesta Actividad Enzimatica

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Extracto*pH
 Extracto = EAM
 pH = 3.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	4.00	-27.2	24.74	-1.100	0.9995
EAM	5.00	93.0	24.74	3.759	0.0490
EAM	6.20	158.8	24.74	6.418	0.0001
EAM	7.32	-29.5	24.74	-1.192	0.9987
EAM	8.13	-31.8	24.74	-1.284	0.9970
EAV	3.00	-68.6	24.74	-2.771	0.3723
EAV	4.00	-61.0	24.74	-2.464	0.5689
EAV	5.00	193.6	24.74	7.827	0.0001
EAV	6.20	168.9	24.74	6.828	0.0001
EAV	7.32	-40.1	24.74	-1.619	0.9698
EAV	8.13	-108.5	24.74	-4.384	0.0097
EGM	3.00	21.8	24.74	0.882	1.0000
EGM	4.00	60.6	24.74	2.449	0.5793
EGM	5.00	179.4	24.74	7.254	0.0001
EGM	6.20	21.8	24.74	0.882	1.0000
EGM	7.32	-35.0	24.74	-1.416	0.9915
EGM	8.13	11.5	24.74	0.464	1.0000

Extracto = EAM
 pH = 4.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	5.00	120.22	24.74	4.860	0.0026
EAM	6.20	186.00	24.74	7.519	0.0001
EAM	7.32	-2.27	24.74	-0.092	1.0000
EAM	8.13	-4.54	24.74	-0.183	1.0000
EAV	3.00	-41.33	24.74	-1.671	0.9604
EAV	4.00	-33.74	24.74	-1.364	0.9943
EAV	5.00	220.84	24.74	8.927	0.0001
EAV	6.20	196.14	24.74	7.929	0.0001
EAV	7.32	-12.84	24.74	-0.519	1.0000
EAV	8.13	-81.23	24.74	-3.284	0.1445
EGM	3.00	49.03	24.74	1.982	0.8588
EGM	4.00	87.79	24.74	3.549	0.0806
EGM	5.00	206.66	24.74	8.354	0.0001
EGM	6.20	49.03	24.74	1.982	0.8588
EGM	7.32	-7.82	24.74	-0.316	1.0000
EGM	8.13	38.69	24.74	1.564	0.9779

Extracto = EAM
 pH = 5.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	6.20	65.8	24.74	2.659	0.4407
EAM	7.32	-122.5	24.74	-4.951	0.0020
EAM	8.13	-124.8	24.74	-5.043	0.0015
EAV	3.00	-161.6	24.74	-6.530	0.0001
EAV	4.00	-154.0	24.74	-6.223	0.0001
EAV	5.00	100.6	24.74	4.067	0.0225
EAV	6.20	75.9	24.74	3.069	0.2218

EAV	7.32	-133.1	24.74	-5.379	0.0006
EAV	8.13	-201.4	24.74	-8.143	0.0001
EGM	3.00	-71.2	24.74	-2.878	0.3129
EGM	4.00	-32.4	24.74	-1.311	0.9963
EGM	5.00	86.4	24.74	3.494	0.0913
EGM	6.20	-71.2	24.74	-2.878	0.3129
EGM	7.32	-128.0	24.74	-5.176	0.0011
EGM	8.13	-81.5	24.74	-3.296	0.1410

Extracto = EAM
pH = 6.20 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	7.32	-188.3	24.74	-7.61	0.0001
EAM	8.13	-190.5	24.74	-7.70	0.0001
EAV	3.00	-227.3	24.74	-9.19	0.0001
EAV	4.00	-219.7	24.74	-8.88	0.0001
EAV	5.00	34.8	24.74	1.41	0.9920
EAV	6.20	10.1	24.74	0.41	1.0000
EAV	7.32	-198.8	24.74	-8.04	0.0001
EAV	8.13	-267.2	24.74	-10.80	0.0001
EGM	3.00	-137.0	24.74	-5.54	0.0004
EGM	4.00	-98.2	24.74	-3.97	0.0290
EGM	5.00	20.7	24.74	0.84	1.0000
EGM	6.20	-137.0	24.74	-5.54	0.0004
EGM	7.32	-193.8	24.74	-7.83	0.0001
EGM	8.13	-147.3	24.74	-5.95	0.0002

Extracto = EAM
pH = 7.32 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	8.13	-2.27	24.74	-0.092	1.0000
EAV	3.00	-39.07	24.74	-1.579	0.9758
EAV	4.00	-31.47	24.74	-1.272	0.9973
EAV	5.00	223.11	24.74	9.019	0.0001
EAV	6.20	198.41	24.74	8.020	0.0001
EAV	7.32	-10.57	24.74	-0.427	1.0000
EAV	8.13	-78.96	24.74	-3.192	0.1745
EGM	3.00	51.30	24.74	2.074	0.8134
EGM	4.00	90.06	24.74	3.641	0.0651
EGM	5.00	208.93	24.74	8.446	0.0001
EGM	6.20	51.30	24.74	2.074	0.8134
EGM	7.32	-5.55	24.74	-0.224	1.0000
EGM	8.13	40.96	24.74	1.656	0.9633

Extracto = EAM
pH = 8.13 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	3.00	-36.80	24.74	-1.488	0.9862
EAV	4.00	-29.20	24.74	-1.180	0.9989
EAV	5.00	225.38	24.74	9.110	0.0001
EAV	6.20	200.68	24.74	8.112	0.0001

EAV	7.32	-8.30	24.74	-0.336	1.0000
EAV	8.13	-76.69	24.74	-3.100	0.2090
EGM	3.00	53.57	24.74	2.165	0.7620
EGM	4.00	92.33	24.74	3.732	0.0523
EGM	5.00	211.20	24.74	8.537	0.0001
EGM	6.20	53.57	24.74	2.165	0.7620
EGM	7.32	-3.28	24.74	-0.133	1.0000
EGM	8.13	43.23	24.74	1.747	0.9429

Extracto = EAV
pH = 3.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	4.00	7.60	24.74	0.307	1.0000
EAV	5.00	262.18	24.74	10.598	0.0001
EAV	6.20	237.48	24.74	9.600	0.0001
EAV	7.32	28.50	24.74	1.152	0.9992
EAV	8.13	-39.90	24.74	-1.613	0.9708
EGM	3.00	90.36	24.74	3.653	0.0633
EGM	4.00	129.13	24.74	5.220	0.0009
EGM	5.00	248.00	24.74	10.025	0.0001
EGM	6.20	90.36	24.74	3.653	0.0633
EGM	7.32	33.51	24.74	1.355	0.9947
EGM	8.13	80.03	24.74	3.235	0.1599

Extracto = EAV
pH = 4.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	5.00	254.58	24.74	10.291	0.0001
EAV	6.20	229.88	24.74	9.292	0.0001
EAV	7.32	20.90	24.74	0.845	1.0000
EAV	8.13	-47.50	24.74	-1.920	0.8856
EGM	3.00	82.77	24.74	3.346	0.1267
EGM	4.00	121.53	24.74	4.913	0.0022
EGM	5.00	240.40	24.74	9.718	0.0001
EGM	6.20	82.77	24.74	3.346	0.1267
EGM	7.32	25.91	24.74	1.048	0.9997
EGM	8.13	72.43	24.74	2.928	0.2870

Extracto = EAV
pH = 5.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	6.20	-24.7	24.74	-1.00	0.9999
EAV	7.32	-233.7	24.74	-9.45	0.0001
EAV	8.13	-302.1	24.74	-12.21	0.0001
EGM	3.00	-171.8	24.74	-6.95	0.0001
EGM	4.00	-133.0	24.74	-5.38	0.0006
EGM	5.00	-14.2	24.74	-0.57	1.0000
EGM	6.20	-171.8	24.74	-6.95	0.0001
EGM	7.32	-228.7	24.74	-9.24	0.0001
EGM	8.13	-182.1	24.74	-7.36	0.0001

Extracto = EAV
 pH = 6.20 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	7.32	-209.0	24.74	-8.45	0.0001
EAV	8.13	-277.4	24.74	-11.21	0.0001
EGM	3.00	-147.1	24.74	-5.95	0.0002
EGM	4.00	-108.4	24.74	-4.38	0.0098
EGM	5.00	10.5	24.74	0.43	1.0000
EGM	6.20	-147.1	24.74	-5.95	0.0002
EGM	7.32	-204.0	24.74	-8.24	0.0001
EGM	8.13	-157.4	24.74	-6.36	0.0001

Extracto = EAV
 pH = 7.32 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	8.13	-68.39	24.74	-2.765	0.3761
EGM	3.00	61.87	24.74	2.501	0.5442
EGM	4.00	100.63	24.74	4.068	0.0225
EGM	5.00	219.50	24.74	8.873	0.0001
EGM	6.20	61.87	24.74	2.501	0.5442
EGM	7.32	5.02	24.74	0.203	1.0000
EGM	8.13	51.53	24.74	2.083	0.8084

Extracto = EAV
 pH = 8.13 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	3.00	130.26	24.74	5.266	0.0008
EGM	4.00	169.02	24.74	6.832	0.0001
EGM	5.00	287.89	24.74	11.638	0.0001
EGM	6.20	130.26	24.74	5.266	0.0008
EGM	7.32	73.41	24.74	2.967	0.2675
EGM	8.13	119.92	24.74	4.848	0.0027

Extracto = EGM
 pH = 3.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	4.00	38.76	24.74	1.567	0.9775
EGM	5.00	157.63	24.74	6.372	0.0001
EGM	6.20	0.00	24.74	0.000	1.0000
EGM	7.32	-56.85	24.74	-2.298	0.6794
EGM	8.13	-10.34	24.74	-0.418	1.0000

Extracto = EGM
 pH = 4.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
----------	----	----------------------	------------------	---------	------------------

EGM	5.00	118.87	24.74	4.805	0.0030
EGM	6.20	-38.76	24.74	-1.567	0.9775
EGM	7.32	-95.61	24.74	-3.865	0.0377
EGM	8.13	-49.10	24.74	-1.985	0.8575

Extracto = EGM
pH = 5.00 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	6.20	-157.6	24.74	-6.372	0.0001
EGM	7.32	-214.5	24.74	-8.670	0.0001
EGM	8.13	-168.0	24.74	-6.790	0.0001

Extracto = EGM
pH = 6.20 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	7.32	-56.85	24.74	-2.298	0.6794
EGM	8.13	-10.34	24.74	-0.418	1.0000

Extracto = EGM
pH = 7.32 restado a:

Extracto	pH	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	8.13	46.51	24.74	1.880	0.9010

ANEXO 7. ANALISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y GRADO DE MADURACIÓN EN LA ACTIVIDAD PFO.

Modelo lineal general: Actividad Enzimática vs. Extracto, Temperatura

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Extracto	fijo	3	EAM, EAV, EGM
Temperatura	fijo	5	5, 20, 40, 60, 90

Análisis de varianza para Actividad Enzimática, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Extracto	2	507308	507308	253654	1109.59	0.000
Temperatura	4	186198	186198	46549	203.63	0.000
Extracto*Temperatura	8	132855	132855	16607	72.65	0.000
Error	30	6858	6858	229		
Total	44	833219				

S = 15.1196 R-cuad. = 99.18% R-cuad.(ajustado) = 98.79%

Observaciones inusuales de Actividad Enzimática

Obs	Actividad Enzimática	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
4	467.926	429.170	8.729	38.756	3.14 R
7	286.113	260.086	8.729	26.028	2.11 R
19	166.718	138.138	8.729	28.580	2.32 R

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95.0%

Variable de respuesta Actividad Enzimática

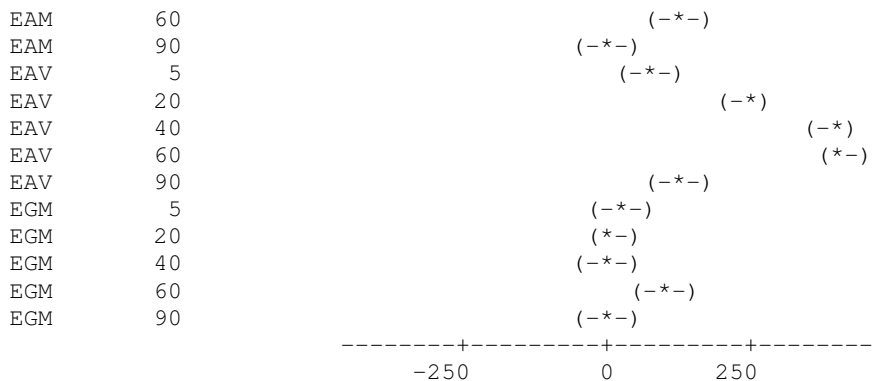
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Extracto*Temperatura

Extracto = EAM

Temperatura = 5 restado a:

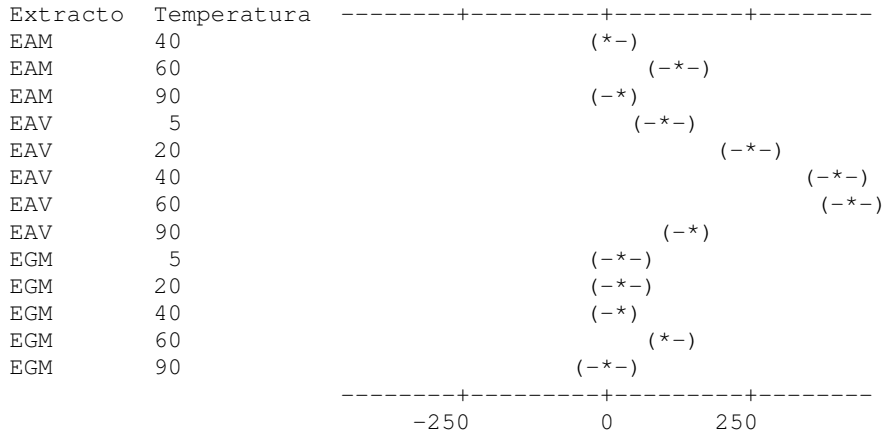
Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAM	20	-56.14	-10.66	34.82
EAM	40	-45.50	-0.02	45.46
EAM	60	71.79	117.27	162.75
EAM	90	-39.36	6.12	51.60
EAV	5	37.38	82.86	128.34
EAV	20	193.74	239.22	284.70
EAV	40	345.53	391.01	436.49
EAV	60	362.82	408.30	453.78
EAV	90	81.46	126.94	172.42
EGM	5	-26.04	19.44	64.92
EGM	20	-33.27	12.21	57.69
EGM	40	-40.25	5.23	50.71
EGM	60	53.30	98.78	144.26
EGM	90	-49.29	-3.81	41.67

Extracto	Temperatura	-----+-----+-----+-----
EAM	20	(-*)
EAM	40	(-*-)



Extracto = EAM
Temperatura = 20 restado a:

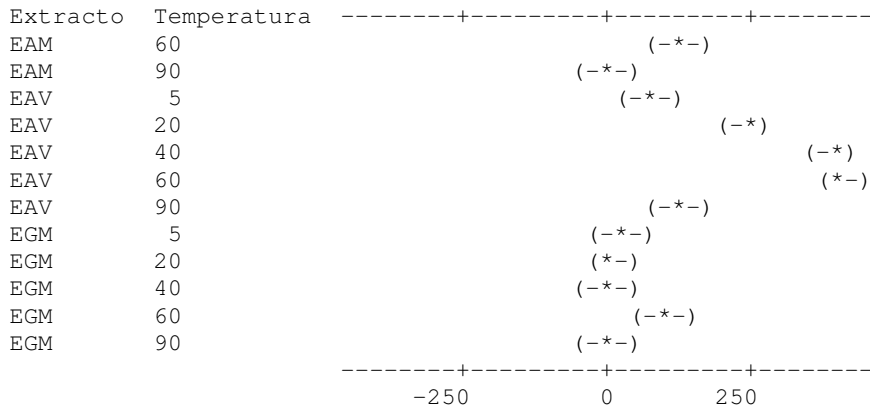
Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAM	40	-34.84	10.638	56.12
EAM	60	82.45	127.930	173.41
EAM	90	-28.69	16.785	62.26
EAV	5	48.04	93.523	139.00
EAV	20	204.40	249.878	295.36
EAV	40	356.19	401.674	447.15
EAV	60	373.48	418.963	464.44
EAV	90	92.12	137.599	183.08
EGM	5	-15.37	30.105	75.58
EGM	20	-22.61	22.870	68.35
EGM	40	-29.59	15.893	61.37
EGM	60	63.96	109.438	154.92
EGM	90	-38.63	6.848	52.33



Extracto = EAM
Temperatura = 40 restado a:

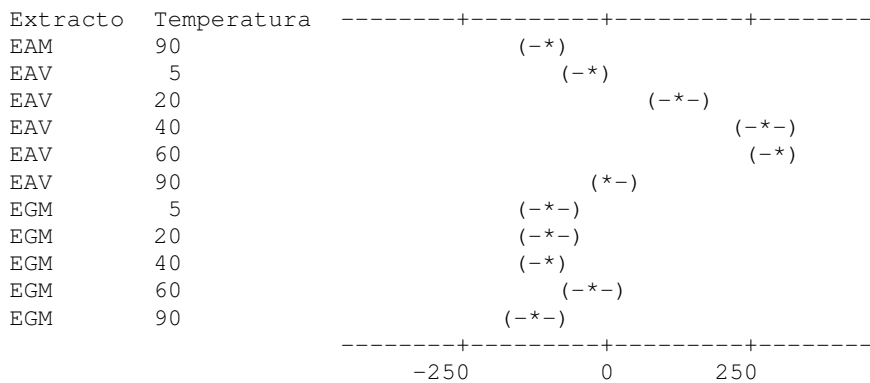
Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAM	60	71.81	117.292	162.77
EAM	90	-39.33	6.147	51.63
EAV	5	37.41	82.885	128.36
EAV	20	193.76	239.240	284.72

EAV	40	345.56	391.036	436.52
EAV	60	362.84	408.324	453.80
EAV	90	81.48	126.961	172.44
EGM	5	-26.01	19.467	64.95
EGM	20	-33.25	12.231	57.71
EGM	40	-40.23	5.254	50.73
EGM	60	53.32	98.800	144.28
EGM	90	-49.27	-3.790	41.69



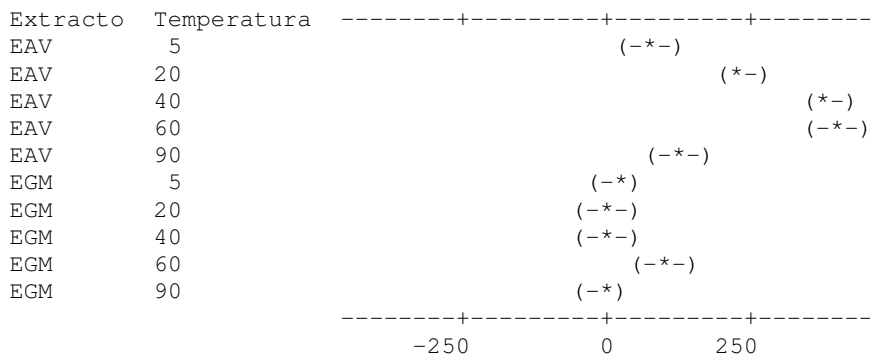
Extracto = EAM
 Temperatura = 60 restado a:

Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAM	90	-156.6	-111.1	-65.67
EAV	5	-79.9	-34.4	11.07
EAV	20	76.5	121.9	167.43
EAV	40	228.3	273.7	319.22
EAV	60	245.6	291.0	336.51
EAV	90	-35.8	9.7	55.15
EGM	5	-143.3	-97.8	-52.35
EGM	20	-150.5	-105.1	-59.58
EGM	40	-157.5	-112.0	-66.56
EGM	60	-64.0	-18.5	26.99
EGM	90	-166.6	-121.1	-75.60



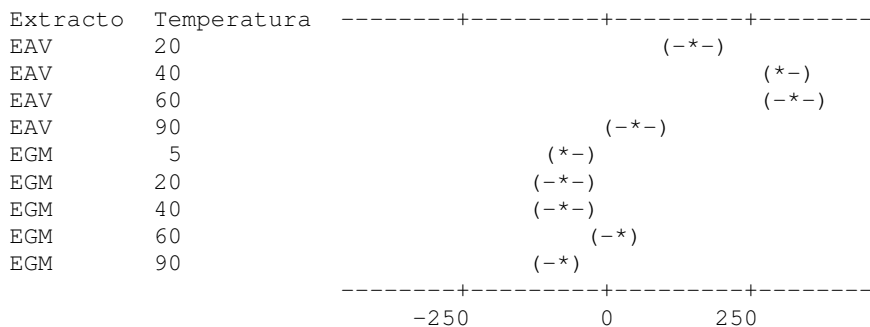
Extracto = EAM
 Temperatura = 90 restado a:

Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAV	5	31.26	76.738	122.22
EAV	20	187.61	233.093	278.57
EAV	40	339.41	384.889	430.37
EAV	60	356.70	402.177	447.66
EAV	90	75.33	120.814	166.29
EGM	5	-32.16	13.320	58.80
EGM	20	-39.40	6.084	51.56
EGM	40	-46.37	-0.893	44.59
EGM	60	47.17	92.653	138.13
EGM	90	-55.42	-9.937	35.54



Extracto = EAV
Temperatura = 5 restado a:

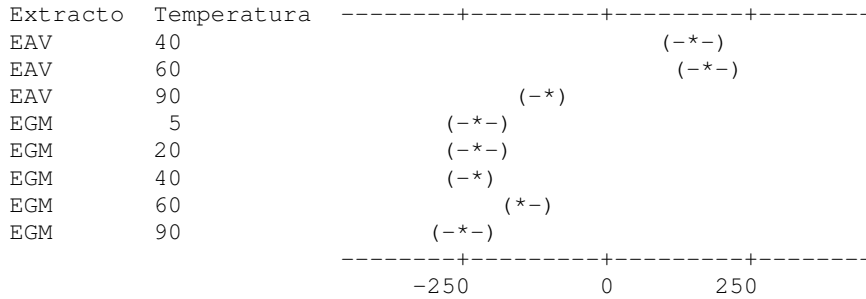
Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAV	20	110.9	156.36	201.84
EAV	40	262.7	308.15	353.63
EAV	60	280.0	325.44	370.92
EAV	90	-1.4	44.08	89.56
EGM	5	-108.9	-63.42	-17.94
EGM	20	-116.1	-70.65	-25.17
EGM	40	-123.1	-77.63	-32.15
EGM	60	-29.6	15.91	61.39
EGM	90	-132.2	-86.68	-41.20



Extracto = EAV
Temperatura = 20 restado a:

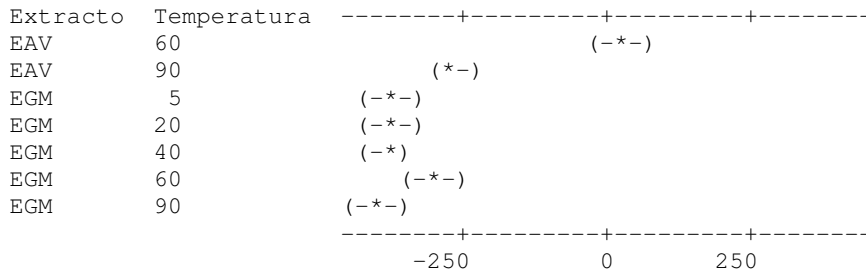
Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
----------	-------------	----------	----------	----------

EAV	40	106.3	151.8	197.3
EAV	60	123.6	169.1	214.6
EAV	90	-157.8	-112.3	-66.8
EGM	5	-265.3	-219.8	-174.3
EGM	20	-272.5	-227.0	-181.5
EGM	40	-279.5	-234.0	-188.5
EGM	60	-185.9	-140.4	-95.0
EGM	90	-288.5	-243.0	-197.6



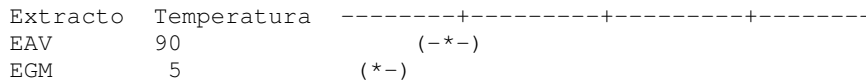
Extracto = EAV
 Temperatura = 40 restado a:

Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAV	60	-28.2	17.3	62.8
EAV	90	-309.6	-264.1	-218.6
EGM	5	-417.0	-371.6	-326.1
EGM	20	-424.3	-378.8	-333.3
EGM	40	-431.3	-385.8	-340.3
EGM	60	-337.7	-292.2	-246.8
EGM	90	-440.3	-394.8	-349.3



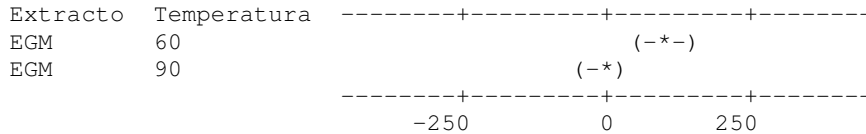
Extracto = EAV
 Temperatura = 60 restado a:

Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EAV	90	-326.8	-281.4	-235.9
EGM	5	-434.3	-388.9	-343.4
EGM	20	-441.6	-396.1	-350.6
EGM	40	-448.5	-403.1	-357.6
EGM	60	-355.0	-309.5	-264.0
EGM	90	-457.6	-412.1	-366.6



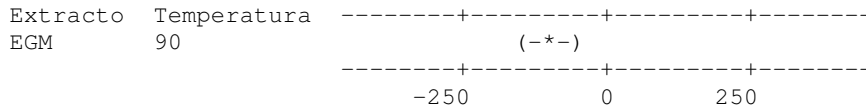
Extracto = EGM
 Temperatura = 40 restado a:

Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EGM	60	48.07	93.545	139.03
EGM	90	-54.52	-9.044	36.44



Extracto = EGM
 Temperatura = 60 restado a:

Extracto	Temperatura	Inferior	Centrada	Superior
EGM	90	-148.1	-102.6	-57.11



Pruebas simultáneas de Tukey

Variable de respuesta Actividad Enzimatica

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Extracto*Temperatura

Extracto = EAM

Temperatura = 5 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	20	-10.66	12.35	-0.8636	0.9999
EAM	40	-0.02	12.35	-0.0018	1.0000
EAM	60	117.27	12.35	9.4993	0.0000
EAM	90	6.12	12.35	0.4961	1.0000
EAV	5	82.86	12.35	6.7122	0.0001
EAV	20	239.22	12.35	19.3775	0.0000
EAV	40	391.01	12.35	31.6736	0.0000
EAV	60	408.30	12.35	33.0740	0.0000
EAV	90	126.94	12.35	10.2825	0.0000
EGM	5	19.44	12.35	1.5751	0.9516
EGM	20	12.21	12.35	0.9890	0.9993
EGM	40	5.23	12.35	0.4238	1.0000
EGM	60	98.78	12.35	8.0013	0.0000
EGM	90	-3.81	12.35	-0.3089	1.0000

Extracto = EAM
 Temperatura = 20 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	40	10.638	12.35	0.8617	0.9999
EAM	60	127.930	12.35	10.3628	0.0000
EAM	90	16.785	12.35	1.3597	0.9852

EAV	5	93.523	12.35	7.5757	0.0000
EAV	20	249.878	12.35	20.2411	0.0000
EAV	40	401.674	12.35	32.5371	0.0000
EAV	60	418.963	12.35	33.9376	0.0000
EAV	90	137.599	12.35	11.1460	0.0000
EGM	5	30.105	12.35	2.4386	0.5079
EGM	20	22.870	12.35	1.8525	0.8576
EGM	40	15.893	12.35	1.2874	0.9909
EGM	60	109.438	12.35	8.8649	0.0000
EGM	90	6.848	12.35	0.5547	1.0000

Extracto = EAM

Temperatura = 40 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	60	117.292	12.35	9.5011	0.0000
EAM	90	6.147	12.35	0.4979	1.0000
EAV	5	82.885	12.35	6.7140	0.0001
EAV	20	239.240	12.35	19.3794	0.0000
EAV	40	391.036	12.35	31.6754	0.0000
EAV	60	408.324	12.35	33.0758	0.0000
EAV	90	126.961	12.35	10.2843	0.0000
EGM	5	19.467	12.35	1.5769	0.9511
EGM	20	12.231	12.35	0.9908	0.9993
EGM	40	5.254	12.35	0.4256	1.0000
EGM	60	98.800	12.35	8.0032	0.0000
EGM	90	-3.790	12.35	-0.3070	1.0000

Extracto = EAM

Temperatura = 60 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	90	-111.1	12.35	-9.003	0.0000
EAV	5	-34.4	12.35	-2.787	0.3054
EAV	20	121.9	12.35	9.878	0.0000
EAV	40	273.7	12.35	22.174	0.0000
EAV	60	291.0	12.35	23.575	0.0000
EAV	90	9.7	12.35	0.783	1.0000
EGM	5	-97.8	12.35	-7.924	0.0000
EGM	20	-105.1	12.35	-8.510	0.0000
EGM	40	-112.0	12.35	-9.075	0.0000
EGM	60	-18.5	12.35	-1.498	0.9670
EGM	90	-121.1	12.35	-9.808	0.0000

Extracto = EAM

Temperatura = 90 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	5	76.738	12.35	6.2161	0.0001
EAV	20	233.093	12.35	18.8814	0.0000
EAV	40	384.889	12.35	31.1775	0.0000
EAV	60	402.177	12.35	32.5779	0.0000
EAV	90	120.814	12.35	9.7864	0.0000
EGM	5	13.320	12.35	1.0790	0.9984

EGM	20	6.084	12.35	0.4929	1.0000
EGM	40	-0.893	12.35	-0.0723	1.0000
EGM	60	92.653	12.35	7.5052	0.0000
EGM	90	-9.937	12.35	-0.8049	0.9999

Extracto = EAV
 Temperatura = 5 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	20	156.36	12.35	12.665	0.0000
EAV	40	308.15	12.35	24.961	0.0000
EAV	60	325.44	12.35	26.362	0.0000
EAV	90	44.08	12.35	3.570	0.0650
EGM	5	-63.42	12.35	-5.137	0.0013
EGM	20	-70.65	12.35	-5.723	0.0003
EGM	40	-77.63	12.35	-6.288	0.0001
EGM	60	15.91	12.35	1.289	0.9907
EGM	90	-86.68	12.35	-7.021	0.0001

Extracto = EAV
 Temperatura = 20 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	40	151.8	12.35	12.30	0.0000
EAV	60	169.1	12.35	13.70	0.0000
EAV	90	-112.3	12.35	-9.10	0.0000
EGM	5	-219.8	12.35	-17.80	0.0000
EGM	20	-227.0	12.35	-18.39	0.0000
EGM	40	-234.0	12.35	-18.95	0.0000
EGM	60	-140.4	12.35	-11.38	0.0000
EGM	90	-243.0	12.35	-19.69	0.0000

Extracto = EAV
 Temperatura = 40 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	60	17.3	12.35	1.40	0.9809
EAV	90	-264.1	12.35	-21.39	0.0000
EGM	5	-371.6	12.35	-30.10	0.0000
EGM	20	-378.8	12.35	-30.68	0.0000
EGM	40	-385.8	12.35	-31.25	0.0000
EGM	60	-292.2	12.35	-23.67	0.0000
EGM	90	-394.8	12.35	-31.98	0.0000

Extracto = EAV
 Temperatura = 60 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	90	-281.4	12.35	-22.79	0.0000
EGM	5	-388.9	12.35	-31.50	0.0000
EGM	20	-396.1	12.35	-32.09	0.0000
EGM	40	-403.1	12.35	-32.65	0.0000

EGM	60	-309.5	12.35	-25.07	0.0000
EGM	90	-412.1	12.35	-33.38	0.0000

Extracto = EAV
 Temperatura = 90 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	5	-107.5	12.35	-8.71	0.0000
EGM	20	-114.7	12.35	-9.29	0.0000
EGM	40	-121.7	12.35	-9.86	0.0000
EGM	60	-28.2	12.35	-2.28	0.6102
EGM	90	-130.8	12.35	-10.59	0.0000

Extracto = EGM
 Temperatura = 5 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	20	-7.24	12.35	-0.586	1.0000
EGM	40	-14.21	12.35	-1.151	0.9968
EGM	60	79.33	12.35	6.426	0.0001
EGM	90	-23.26	12.35	-1.884	0.8431

Extracto = EGM
 Temperatura = 20 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	40	-6.98	12.35	-0.565	1.0000
EGM	60	86.57	12.35	7.012	0.0001
EGM	90	-16.02	12.35	-1.298	0.9902

Extracto = EGM
 Temperatura = 40 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	60	93.545	12.35	7.5775	0.0000
EGM	90	-9.044	12.35	-0.7326	1.0000

Extracto = EGM
 Temperatura = 60 restado a:

Extracto	Temperatura	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	90	-102.6	12.35	-8.310	0.0000

ANEXO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y GRADO DE MADURACIÓN EN LA ACTIVIDAD PFO.

Modelo lineal general: Actividad Enzimática vs. Extracto, Concentración

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Extracto	fijo	3	EAM, EAV, EGM
Concentración	fijo	7	0.00, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.16, 0.30

Análisis de varianza para Actividad Enzimática, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Extracto	2	1132803	1131169	565585	227.37	0.000
Concentración	6	1557654	1569247	261541	105.14	0.000
Extracto*Concentración	12	410475	410475	34206	13.75	0.000
Error	31	77114	77114	2488		
Total	51	3178046				

S = 49.8753 R-cuad. = 97.57% R-cuad. (ajustado) = 96.01%

Observaciones inusuales de Actividad Enzimática

Obs	Actividad Enzimática	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
3	489.946	418.495	35.267	71.450	2.03 R
5	775.748	861.942	28.796	-86.194	-2.12 R
7	347.045	418.495	35.267	-71.450	-2.03 R
17	952.673	861.942	28.796	90.731	2.23 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95.0%

Variable de respuesta Actividad Enzimática

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de

Extracto*Concentración

Extracto = EAM

Concentración = 0.00 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAM	0.02	-120.4	56.707	233.8
EAM	0.04	-87.4	106.609	300.6
EAM	0.08	-49.9	144.035	338.0
EAM	0.10	-1.2	192.803	386.8
EAM	0.16	200.6	377.667	554.7
EAM	0.30	273.2	450.251	627.3
EAV	0.00	-196.2	-2.268	191.7
EAV	0.02	1.0	178.059	355.1
EAV	0.04	212.1	406.020	600.0
EAV	0.08	284.5	461.593	638.7
EAV	0.10	525.1	719.041	913.0
EAV	0.16	514.9	708.834	902.8
EAV	0.30	672.4	849.466	1026.5
EGM	0.00	-181.5	12.475	206.4
EGM	0.02	-146.4	30.622	207.7

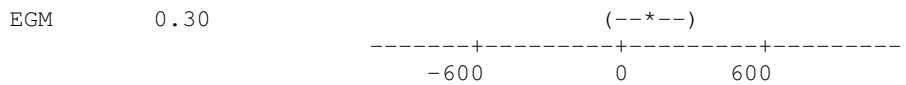
EGM	0.04	-121.4	72.585	266.6
EGM	0.08	-60.3	116.816	293.9
EGM	0.10	-4.6	189.400	383.4
EGM	0.16	73.6	250.644	427.7
EGM	0.30	48.6	225.693	402.8

Extracto	Concentración	-----+-----+-----+-----
EAM	0.02	(--*--)
EAM	0.04	(--*--)
EAM	0.08	(--*--)
EAM	0.10	(--*--)
EAM	0.16	(--*--)
EAM	0.30	(--*--)
EAV	0.00	(--*--)
EAV	0.02	(--*--)
EAV	0.04	(--*--)
EAV	0.08	(--*--)
EAV	0.10	(--*--)
EAV	0.16	(--*--)
EAV	0.30	(--*--)
EGM	0.00	(--*--)
EGM	0.02	(--*--)
EGM	0.04	(--*--)
EGM	0.08	(--*--)
EGM	0.10	(--*--)
EGM	0.16	(--*--)
EGM	0.30	(--*--)
		-----+-----+-----+-----
		-600 0 600

Extracto = EAM
Concentración = 0.02 restado a:

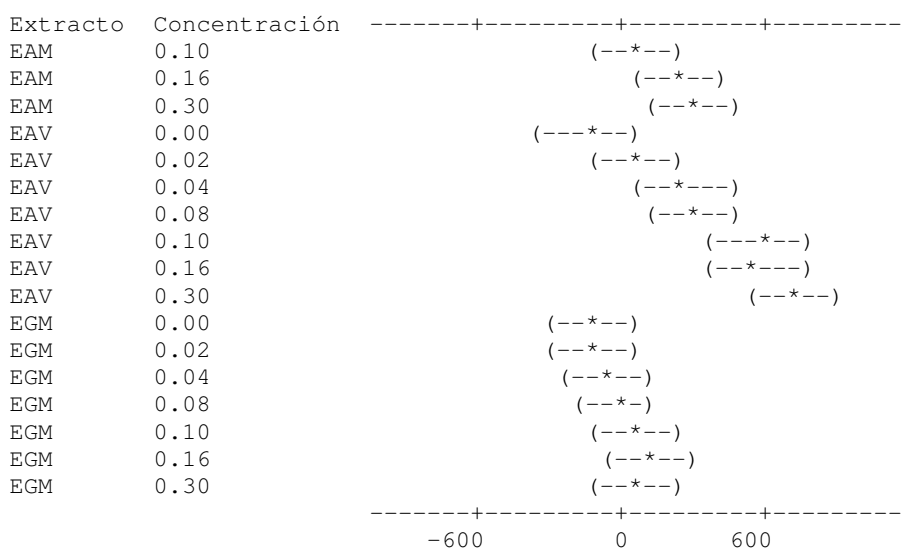
Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAM	0.04	-127.2	49.90	227.0
EAM	0.08	-89.7	87.33	264.4
EAM	0.10	-41.0	136.10	313.2
EAM	0.16	162.6	320.96	479.3
EAM	0.30	235.2	393.54	551.9
EAV	0.00	-236.0	-58.97	118.1
EAV	0.02	-37.0	121.35	279.7
EAV	0.04	172.2	349.31	526.4
EAV	0.08	246.5	404.89	563.3
EAV	0.10	485.3	662.33	839.4
EAV	0.16	475.1	652.13	829.2
EAV	0.30	634.4	792.76	951.1
EGM	0.00	-221.3	-44.23	132.8
EGM	0.02	-184.5	-26.09	132.3
EGM	0.04	-161.2	15.88	192.9
EGM	0.08	-98.3	60.11	218.5
EGM	0.10	-44.4	132.69	309.8
EGM	0.16	35.6	193.94	352.3
EGM	0.30	10.6	168.99	327.4

Extracto	Concentración	-----+-----+-----+-----
EAM	0.04	(--*--)
EAM	0.08	(--*--)
EAM	0.10	(--*--)
EAM	0.16	(--*--)



Extracto = EAM
 Concentración = 0.08 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAM	0.10	-145.2	48.8	242.74
EAM	0.16	56.6	233.6	410.70
EAM	0.30	129.1	306.2	483.29
EAV	0.00	-340.3	-146.3	47.67
EAV	0.02	-143.0	34.0	211.09
EAV	0.04	68.0	262.0	455.95
EAV	0.08	140.5	317.6	494.63
EAV	0.10	381.0	575.0	768.98
EAV	0.16	370.8	564.8	758.77
EAV	0.30	528.4	705.4	882.50
EGM	0.00	-325.5	-131.6	62.41
EGM	0.02	-290.5	-113.4	63.66
EGM	0.04	-265.4	-71.5	122.52
EGM	0.08	-204.3	-27.2	149.85
EGM	0.10	-148.6	45.4	239.33
EGM	0.16	-70.5	106.6	283.68
EGM	0.30	-95.4	81.7	258.73



Extracto = EAM
 Concentración = 0.10 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAM	0.16	7.8	184.9	361.933
EAM	0.30	80.4	257.4	434.517
EAV	0.00	-389.0	-195.1	-1.102
EAV	0.02	-191.8	-14.7	162.325
EAV	0.04	19.2	213.2	407.187
EAV	0.08	91.7	268.8	445.859
EAV	0.10	332.3	526.2	720.208

EGM	0.00	(--*--)
EGM	0.02	(-*--)
EGM	0.04	(--*--)
EGM	0.08	(-*--)
EGM	0.10	(--*--)
EGM	0.16	(--*--)
EGM	0.30	(-*--)

-----+-----+-----+-----
-600 0 600

Extracto = EAM
Concentración = 0.30 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.00	-629.6	-452.5	-275.5
EAV	0.02	-430.6	-272.2	-113.8
EAV	0.04	-221.3	-44.2	132.8
EAV	0.08	-147.0	11.3	169.7
EAV	0.10	91.7	268.8	445.9
EAV	0.16	81.5	258.6	435.7
EAV	0.30	240.8	399.2	557.6
EGM	0.00	-614.8	-437.8	-260.7
EGM	0.02	-578.0	-419.6	-261.3
EGM	0.04	-554.7	-377.7	-200.6
EGM	0.08	-491.8	-333.4	-175.1
EGM	0.10	-437.9	-260.9	-83.8
EGM	0.16	-358.0	-199.6	-41.2
EGM	0.30	-382.9	-224.6	-66.2

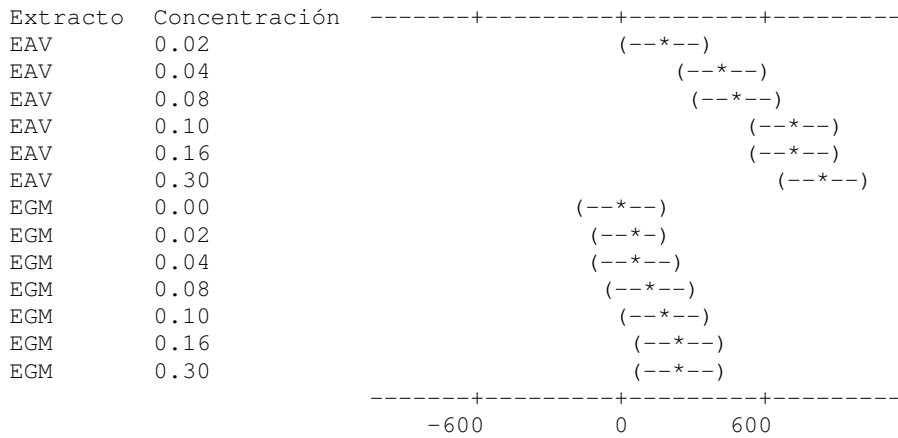
Extracto	Concentración	-----+-----+-----+-----
EAV	0.00	(-*--)
EAV	0.02	(-*--)
EAV	0.04	(--*--)
EAV	0.08	(-*--)
EAV	0.10	(-*--)
EAV	0.16	(--*--)
EAV	0.30	(--*--)
EGM	0.00	(--*--)
EGM	0.02	(--*--)
EGM	0.04	(--*--)
EGM	0.08	(-*--)
EGM	0.10	(--*--)
EGM	0.16	(--*--)
EGM	0.30	(-*--)

-----+-----+-----+-----
-600 0 600

Extracto = EAV
Concentración = 0.00 restado a:

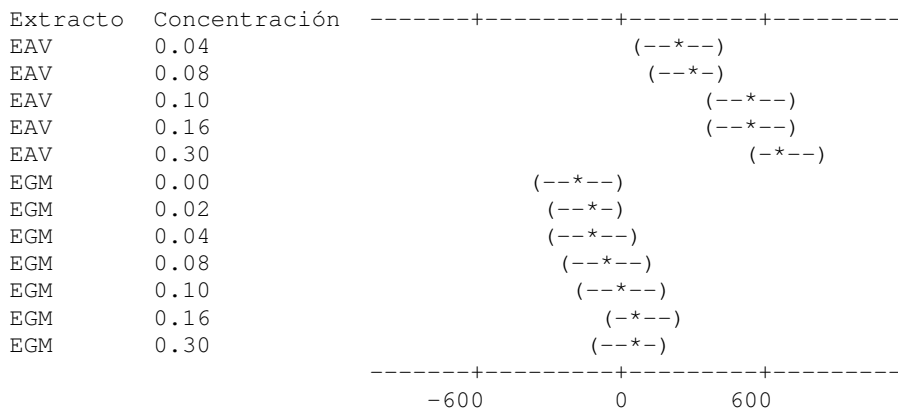
Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.02	3.3	180.33	357.4
EAV	0.04	214.3	408.29	602.3
EAV	0.08	286.8	463.86	640.9
EAV	0.10	527.3	721.31	915.3
EAV	0.16	517.1	711.10	905.1
EAV	0.30	674.7	851.73	1028.8
EGM	0.00	-179.2	14.74	208.7

EGM	0.02	-144.2	32.89	210.0
EGM	0.04	-119.1	74.85	268.8
EGM	0.08	-58.0	119.08	296.2
EGM	0.10	-2.3	191.67	385.6
EGM	0.16	75.8	252.91	430.0
EGM	0.30	50.9	227.96	405.0



Extracto = EAV
Concentración = 0.02 restado a:

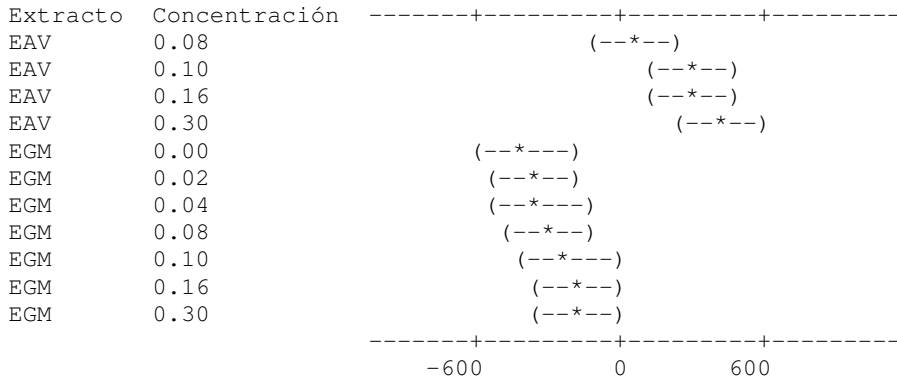
Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.04	50.9	228.0	405.03
EAV	0.08	125.2	283.5	441.91
EAV	0.10	363.9	541.0	718.05
EAV	0.16	353.7	530.8	707.84
EAV	0.30	513.0	671.4	829.78
EGM	0.00	-342.7	-165.6	11.49
EGM	0.02	-305.8	-147.4	10.94
EGM	0.04	-282.5	-105.5	71.59
EGM	0.08	-219.6	-61.2	97.13
EGM	0.10	-165.7	11.3	188.41
EGM	0.16	-85.8	72.6	230.96
EGM	0.30	-110.7	47.6	206.01



Extracto = EAV

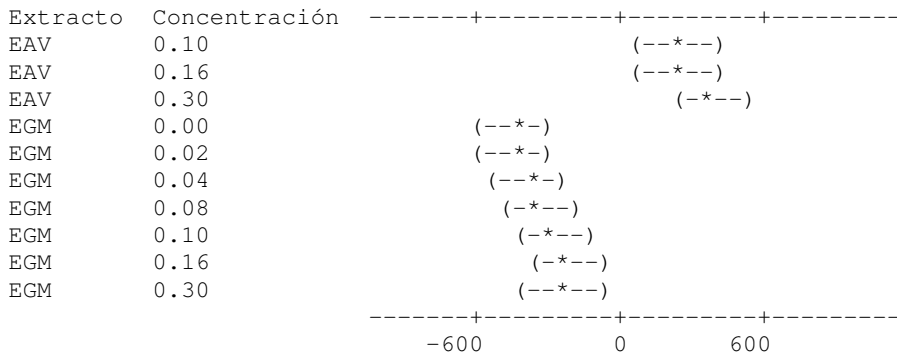
Concentración = 0.04 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.08	-121.5	55.6	232.6
EAV	0.10	119.1	313.0	507.0
EAV	0.16	108.8	302.8	496.8
EAV	0.30	266.4	443.4	620.5
EGM	0.00	-587.5	-393.5	-199.6
EGM	0.02	-552.5	-375.4	-198.3
EGM	0.04	-527.4	-333.4	-139.5
EGM	0.08	-466.3	-289.2	-112.1
EGM	0.10	-410.6	-216.6	-22.7
EGM	0.16	-332.4	-155.4	21.7
EGM	0.30	-357.4	-180.3	-3.3



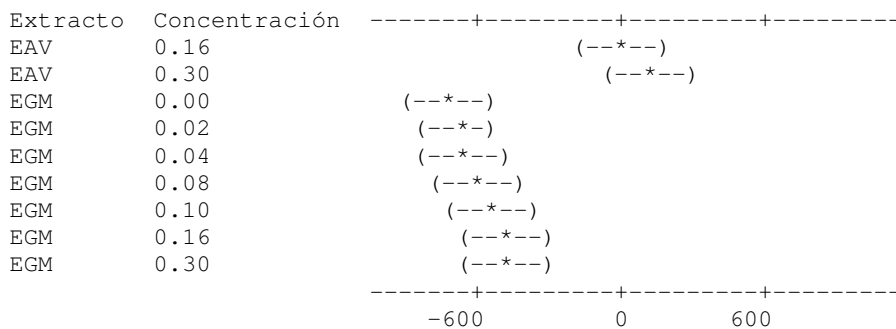
Extracto = EAV
 Concentración = 0.08 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.10	80.4	257.4	434.5
EAV	0.16	70.2	247.2	424.3
EAV	0.30	229.5	387.9	546.2
EGM	0.00	-626.2	-449.1	-272.0
EGM	0.02	-589.3	-431.0	-272.6
EGM	0.04	-566.1	-389.0	-211.9
EGM	0.08	-503.2	-344.8	-186.4
EGM	0.10	-449.3	-272.2	-95.1
EGM	0.16	-369.3	-210.9	-52.6
EGM	0.30	-394.3	-235.9	-77.5



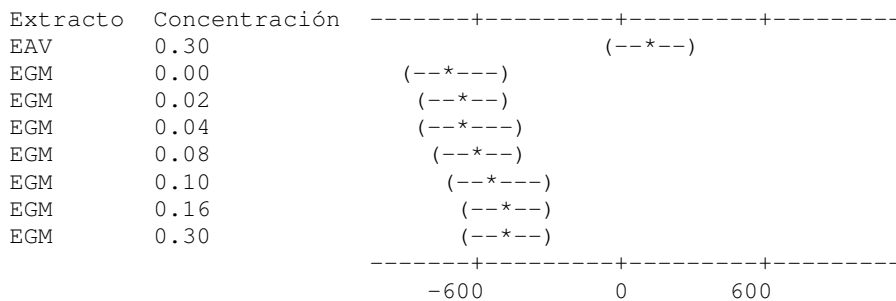
Extracto = EAV
 Concentración = 0.10 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.16	-204.2	-10.2	183.8
EAV	0.30	-46.6	130.4	307.5
EGM	0.00	-900.5	-706.6	-512.6
EGM	0.02	-865.5	-688.4	-511.4
EGM	0.04	-840.4	-646.5	-452.5
EGM	0.08	-779.3	-602.2	-425.2
EGM	0.10	-723.6	-529.6	-335.7
EGM	0.16	-645.5	-468.4	-291.3
EGM	0.30	-670.4	-493.3	-316.3



Extracto = EAV
 Concentración = 0.16 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EAV	0.30	-36.4	140.6	317.7
EGM	0.00	-890.3	-696.4	-502.4
EGM	0.02	-855.3	-678.2	-501.1
EGM	0.04	-830.2	-636.2	-442.3
EGM	0.08	-769.1	-592.0	-414.9
EGM	0.10	-713.4	-519.4	-325.5
EGM	0.16	-635.3	-458.2	-281.1
EGM	0.30	-660.2	-483.1	-306.1



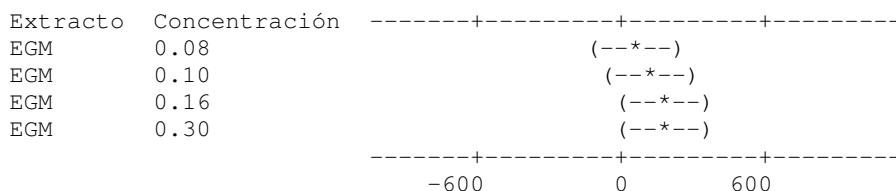
Extracto = EAV
 Concentración = 0.30 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EGM	0.00	-1014	-837.0	-659.9

Extracto = EGM

Concentración = 0.04 restado a:

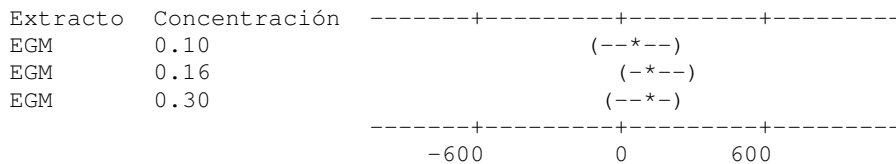
Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EGM	0.08	-132.8	44.23	221.3
EGM	0.10	-77.2	116.82	310.8
EGM	0.16	1.0	178.06	355.1
EGM	0.30	-24.0	153.11	330.2



Extracto = EGM

Concentración = 0.08 restado a:

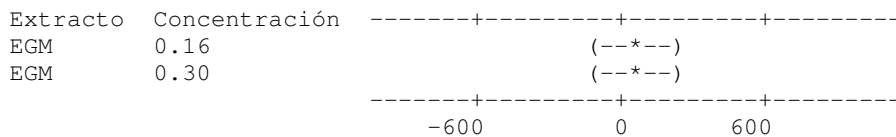
Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EGM	0.10	-104.5	72.58	249.7
EGM	0.16	-24.5	133.83	292.2
EGM	0.30	-49.5	108.88	267.3



Extracto = EGM

Concentración = 0.10 restado a:

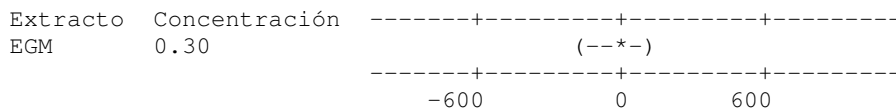
Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EGM	0.16	-115.8	61.24	238.3
EGM	0.30	-140.8	36.29	213.4



Extracto = EGM

Concentración = 0.16 restado a:

Extracto	Concentración	Inferior	Centrada	Superior
EGM	0.30	-183.3	-24.95	133.4



Pruebas simultáneas de Tukey
 Variable de respuesta Actividad Enzimática
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de
 Extracto*Concentración
 Extracto = EAM
 Concentración = 0.00 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	0.02	56.707	45.53	1.2455	0.9992
EAM	0.04	106.609	49.88	2.1375	0.8305
EAM	0.08	144.035	49.88	2.8879	0.3677
EAM	0.10	192.803	49.88	3.8657	0.0532
EAM	0.16	377.667	45.53	8.2950	0.0001
EAM	0.30	450.251	45.53	9.8892	0.0001
EAV	0.00	-2.268	49.88	-0.0455	1.0000
EAV	0.02	178.059	45.53	3.9108	0.0479
EAV	0.04	406.020	49.88	8.1407	0.0001
EAV	0.08	461.593	45.53	10.1383	0.0001
EAV	0.10	719.041	49.88	14.4168	0.0001
EAV	0.16	708.834	49.88	14.2121	0.0001
EAV	0.30	849.466	45.53	18.6574	0.0001
EGM	0.00	12.475	49.88	0.2501	1.0000
EGM	0.02	30.622	45.53	0.6726	1.0000
EGM	0.04	72.585	49.88	1.4553	0.9944
EGM	0.08	116.816	45.53	2.5657	0.5694
EGM	0.10	189.400	49.88	3.7975	0.0622
EGM	0.16	250.644	45.53	5.5051	0.0008
EGM	0.30	225.693	45.53	4.9570	0.0034

Extracto = EAM
 Concentración = 0.02 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	0.04	49.90	45.53	1.096	0.9999
EAM	0.08	87.33	45.53	1.918	0.9210
EAM	0.10	136.10	45.53	2.989	0.3127
EAM	0.16	320.96	40.72	7.882	0.0001
EAM	0.30	393.54	40.72	9.664	0.0001
EAV	0.00	-58.97	45.53	-1.295	0.9986
EAV	0.02	121.35	40.72	2.980	0.3175
EAV	0.04	349.31	45.53	7.672	0.0001
EAV	0.08	404.89	40.72	9.942	0.0001
EAV	0.10	662.33	45.53	14.547	0.0001
EAV	0.16	652.13	45.53	14.323	0.0001
EAV	0.30	792.76	40.72	19.467	0.0001
EGM	0.00	-44.23	45.53	-0.971	1.0000
EGM	0.02	-26.09	40.72	-0.641	1.0000
EGM	0.04	15.88	45.53	0.349	1.0000
EGM	0.08	60.11	40.72	1.476	0.9935
EGM	0.10	132.69	45.53	2.914	0.3528
EGM	0.16	193.94	40.72	4.762	0.0057
EGM	0.30	168.99	40.72	4.150	0.0270

Extracto = EAM
 Concentración = 0.04 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	0.08	37.4	49.88	0.750	1.0000
EAM	0.10	86.2	49.88	1.728	0.9674
EAM	0.16	271.1	45.53	5.953	0.0003
EAM	0.30	343.6	45.53	7.548	0.0001
EAV	0.00	-108.9	49.88	-2.183	0.8070
EAV	0.02	71.5	45.53	1.569	0.9873
EAV	0.04	299.4	49.88	6.003	0.0003
EAV	0.08	355.0	45.53	7.797	0.0001
EAV	0.10	612.4	49.88	12.279	0.0001
EAV	0.16	602.2	49.88	12.075	0.0001
EAV	0.30	742.9	45.53	16.316	0.0001
EGM	0.00	-94.1	49.88	-1.887	0.9305
EGM	0.02	-76.0	45.53	-1.669	0.9765
EGM	0.04	-34.0	49.88	-0.682	1.0000
EGM	0.08	10.2	45.53	0.224	1.0000
EGM	0.10	82.8	49.88	1.660	0.9777
EGM	0.16	144.0	45.53	3.164	0.2310
EGM	0.30	119.1	45.53	2.616	0.5366

Extracto = EAM
 Concentración = 0.08 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	0.10	48.8	49.88	0.978	1.0000
EAM	0.16	233.6	45.53	5.131	0.0022
EAM	0.30	306.2	45.53	6.726	0.0001
EAV	0.00	-146.3	49.88	-2.933	0.3424
EAV	0.02	34.0	45.53	0.747	1.0000
EAV	0.04	262.0	49.88	5.253	0.0016
EAV	0.08	317.6	45.53	6.975	0.0001
EAV	0.10	575.0	49.88	11.529	0.0001
EAV	0.16	564.8	49.88	11.324	0.0001
EAV	0.30	705.4	45.53	15.494	0.0001
EGM	0.00	-131.6	49.88	-2.638	0.5220
EGM	0.02	-113.4	45.53	-2.491	0.6188
EGM	0.04	-71.5	49.88	-1.433	0.9953
EGM	0.08	-27.2	45.53	-0.598	1.0000
EGM	0.10	45.4	49.88	0.910	1.0000
EGM	0.16	106.6	45.53	2.342	0.7150
EGM	0.30	81.7	45.53	1.794	0.9546

Extracto = EAM
 Concentración = 0.10 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	0.16	184.9	45.53	4.060	0.0336
EAM	0.30	257.4	45.53	5.655	0.0006
EAV	0.00	-195.1	49.88	-3.911	0.0478
EAV	0.02	-14.7	45.53	-0.324	1.0000
EAV	0.04	213.2	49.88	4.275	0.0198
EAV	0.08	268.8	45.53	5.904	0.0003
EAV	0.10	526.2	49.88	10.551	0.0001
EAV	0.16	516.0	49.88	10.346	0.0001

EAV	0.30	656.7	45.53	14.423	0.0001
EGM	0.00	-180.3	49.88	-3.616	0.0932
EGM	0.02	-162.2	45.53	-3.562	0.1046
EGM	0.04	-120.2	49.88	-2.410	0.6714
EGM	0.08	-76.0	45.53	-1.669	0.9765
EGM	0.10	-3.4	49.88	-0.068	1.0000
EGM	0.16	57.8	45.53	1.270	0.9989
EGM	0.30	32.9	45.53	0.722	1.0000

Extracto = EAM

Concentración = 0.16 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAM	0.30	72.6	40.72	1.782	0.9570
EAV	0.00	-379.9	45.53	-8.345	0.0001
EAV	0.02	-199.6	40.72	-4.902	0.0040
EAV	0.04	28.4	45.53	0.623	1.0000
EAV	0.08	83.9	40.72	2.061	0.8666
EAV	0.10	341.4	45.53	7.498	0.0001
EAV	0.16	331.2	45.53	7.274	0.0001
EAV	0.30	471.8	40.72	11.586	0.0001
EGM	0.00	-365.2	45.53	-8.021	0.0001
EGM	0.02	-347.0	40.72	-8.522	0.0001
EGM	0.04	-305.1	45.53	-6.701	0.0001
EGM	0.08	-260.9	40.72	-6.405	0.0001
EGM	0.10	-188.3	45.53	-4.135	0.0280
EGM	0.16	-127.0	40.72	-3.119	0.2501
EGM	0.30	-152.0	40.72	-3.732	0.0721

Extracto = EAM

Concentración = 0.30 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.00	-452.5	45.53	-9.94	0.0001
EAV	0.02	-272.2	40.72	-6.68	0.0001
EAV	0.04	-44.2	45.53	-0.97	1.0000
EAV	0.08	11.3	40.72	0.28	1.0000
EAV	0.10	268.8	45.53	5.90	0.0003
EAV	0.16	258.6	45.53	5.68	0.0005
EAV	0.30	399.2	40.72	9.80	0.0001
EGM	0.00	-437.8	45.53	-9.62	0.0001
EGM	0.02	-419.6	40.72	-10.30	0.0001
EGM	0.04	-377.7	45.53	-8.29	0.0001
EGM	0.08	-333.4	40.72	-8.19	0.0001
EGM	0.10	-260.9	45.53	-5.73	0.0005
EGM	0.16	-199.6	40.72	-4.90	0.0040
EGM	0.30	-224.6	40.72	-5.51	0.0008

Extracto = EAV

Concentración = 0.00 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.02	180.33	45.53	3.9607	0.0426
EAV	0.04	408.29	49.88	8.1862	0.0001

EAV	0.08	463.86	45.53	10.1881	0.0001
EAV	0.10	721.31	49.88	14.4623	0.0001
EAV	0.16	711.10	49.88	14.2576	0.0001
EAV	0.30	851.73	45.53	18.7072	0.0001
EGM	0.00	14.74	49.88	0.2956	1.0000
EGM	0.02	32.89	45.53	0.7224	1.0000
EGM	0.04	74.85	49.88	1.5008	0.9921
EGM	0.08	119.08	45.53	2.6155	0.5366
EGM	0.10	191.67	49.88	3.8430	0.0560
EGM	0.16	252.91	45.53	5.5549	0.0007
EGM	0.30	227.96	45.53	5.0069	0.0030

Extracto = EAV
 Concentración = 0.02 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.04	228.0	45.53	5.007	0.0030
EAV	0.08	283.5	40.72	6.962	0.0001
EAV	0.10	541.0	45.53	11.882	0.0001
EAV	0.16	530.8	45.53	11.658	0.0001
EAV	0.30	671.4	40.72	16.487	0.0001
EGM	0.00	-165.6	45.53	-3.637	0.0890
EGM	0.02	-147.4	40.72	-3.620	0.0922
EGM	0.04	-105.5	45.53	-2.317	0.7303
EGM	0.08	-61.2	40.72	-1.504	0.9920
EGM	0.10	11.3	45.53	0.249	1.0000
EGM	0.16	72.6	40.72	1.782	0.9570
EGM	0.30	47.6	40.72	1.170	0.9996

Extracto = EAV
 Concentración = 0.04 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.08	55.6	45.53	1.221	0.9994
EAV	0.10	313.0	49.88	6.276	0.0002
EAV	0.16	302.8	49.88	6.071	0.0002
EAV	0.30	443.4	45.53	9.740	0.0001
EGM	0.00	-393.5	49.88	-7.891	0.0001
EGM	0.02	-375.4	45.53	-8.245	0.0001
EGM	0.04	-333.4	49.88	-6.685	0.0001
EGM	0.08	-289.2	45.53	-6.352	0.0001
EGM	0.10	-216.6	49.88	-4.343	0.0167
EGM	0.16	-155.4	45.53	-3.413	0.1429
EGM	0.30	-180.3	45.53	-3.961	0.0426

Extracto = EAV
 Concentración = 0.08 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.10	257.4	45.53	5.65	0.0006
EAV	0.16	247.2	45.53	5.43	0.0010
EAV	0.30	387.9	40.72	9.52	0.0001
EGM	0.00	-449.1	45.53	-9.86	0.0001
EGM	0.02	-431.0	40.72	-10.58	0.0001

EGM	0.04	-389.0	45.53	-8.54	0.0001
EGM	0.08	-344.8	40.72	-8.47	0.0001
EGM	0.10	-272.2	45.53	-5.98	0.0003
EGM	0.16	-210.9	40.72	-5.18	0.0019
EGM	0.30	-235.9	40.72	-5.79	0.0004

Extracto = EAV

Concentración = 0.10 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.16	-10.2	49.88	-0.20	1.0000
EAV	0.30	130.4	45.53	2.86	0.3811
EGM	0.00	-706.6	49.88	-14.17	0.0001
EGM	0.02	-688.4	45.53	-15.12	0.0001
EGM	0.04	-646.5	49.88	-12.96	0.0001
EGM	0.08	-602.2	45.53	-13.23	0.0001
EGM	0.10	-529.6	49.88	-10.62	0.0001
EGM	0.16	-468.4	45.53	-10.29	0.0001
EGM	0.30	-493.3	45.53	-10.84	0.0001

Extracto = EAV

Concentración = 0.16 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EAV	0.30	140.6	45.53	3.09	0.2639
EGM	0.00	-696.4	49.88	-13.96	0.0001
EGM	0.02	-678.2	45.53	-14.90	0.0001
EGM	0.04	-636.2	49.88	-12.76	0.0001
EGM	0.08	-592.0	45.53	-13.00	0.0001
EGM	0.10	-519.4	49.88	-10.41	0.0001
EGM	0.16	-458.2	45.53	-10.06	0.0001
EGM	0.30	-483.1	45.53	-10.61	0.0001

Extracto = EAV

Concentración = 0.30 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.00	-837.0	45.53	-18.38	0.0001
EGM	0.02	-818.8	40.72	-20.11	0.0001
EGM	0.04	-776.9	45.53	-17.06	0.0001
EGM	0.08	-732.7	40.72	-17.99	0.0001
EGM	0.10	-660.1	45.53	-14.50	0.0001
EGM	0.16	-598.8	40.72	-14.70	0.0001
EGM	0.30	-623.8	40.72	-15.32	0.0001

Extracto = EGM

Concentración = 0.00 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.02	18.15	45.53	0.3986	1.0000
EGM	0.04	60.11	49.88	1.2052	0.9995
EGM	0.08	104.34	45.53	2.2917	0.7454

EGM	0.10	176.92	49.88	3.5473	0.1080
EGM	0.16	238.17	45.53	5.2311	0.0017
EGM	0.30	213.22	45.53	4.6830	0.0070

Extracto = EGM
Concentración = 0.02 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.04	41.96	45.53	0.9217	1.0000
EGM	0.08	86.19	40.72	2.1166	0.8408
EGM	0.10	158.78	45.53	3.4874	0.1225
EGM	0.16	220.02	40.72	5.4029	0.0011
EGM	0.30	195.07	40.72	4.7902	0.0053

Extracto = EGM
Concentración = 0.04 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.08	44.23	45.53	0.9715	1.0000
EGM	0.10	116.82	49.88	2.3422	0.7146
EGM	0.16	178.06	45.53	3.9108	0.0479
EGM	0.30	153.11	45.53	3.3628	0.1579

Extracto = EGM
Concentración = 0.08 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.10	72.58	45.53	1.594	0.9851
EGM	0.16	133.83	40.72	3.286	0.1834
EGM	0.30	108.88	40.72	2.674	0.4987

Extracto = EGM
Concentración = 0.10 restado a:

Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.16	61.24	45.53	1.3451	0.9978
EGM	0.30	36.29	45.53	0.7971	1.0000

Extracto = EGM
Concentración = 0.16 restado a:

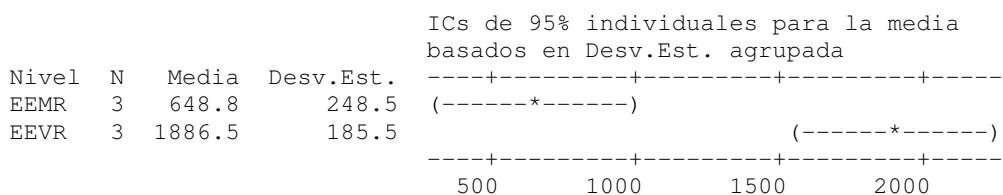
Extracto	Concentración	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EGM	0.30	-24.95	40.72	-0.6127	1.000

ANEXO 9. ANÁLISIS DE VARIANZAS PARA EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS ETANOLICOS SECADOS POR ROTOEVAPORACION.

ANOVA unidireccional: Polifenoles Totales vs. Extracto

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Extracto	1	2297608	2297608	47.80	0.002
Error	4	192272	48068		
Total	5	2489880			

S = 219.2 R-cuad. = 92.28% R-cuad.(ajustado) = 90.35%

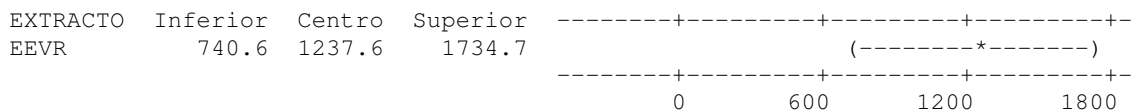


Desv.Est. agrupada = 219.2

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de EXTRACTO

Nivel de confianza individual = 95.00%

EXTRACTO = EEMR restado de:



ANEXO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO Y SOLUCIONES DE ACIDO GALICO EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HIALURONIDASA.

Modelo lineal general: % DE INHIBICION vs. EXTRACTO, CONCENTRACION

Factor	Tipo	Niveles	Valores
EXTRACTO	fijo	4	AGM, AGV, EEMR, EEVR
CONCENTRACION	fijo	5	0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25

Análisis de varianza para % DE INHIBICION, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
EXTRACTO	3	0.255545	0.255545	0.085182	30.47	0.000
CONCENTRACION	4	0.147602	0.147602	0.036900	13.20	0.000
EXTRACTO*CONCENTRACION	12	0.615232	0.615232	0.051269	18.34	0.000
Error	40	0.111827	0.111827	0.002796		
Total	59	1.130206				

S = 0.0528741 R-cuad. = 90.11% R-cuad.(ajustado) = 85.41%

Observaciones inusuales de % DE INHIBICION

Obs	% DE INHIBICION	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	Residuo estándar
47	0.080000	-0.030000	0.030527	0.110000	2.55 R
49	0.330000	0.243333	0.030527	0.086667	2.01 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95.0%

Variable de respuesta % DE INHIBICION

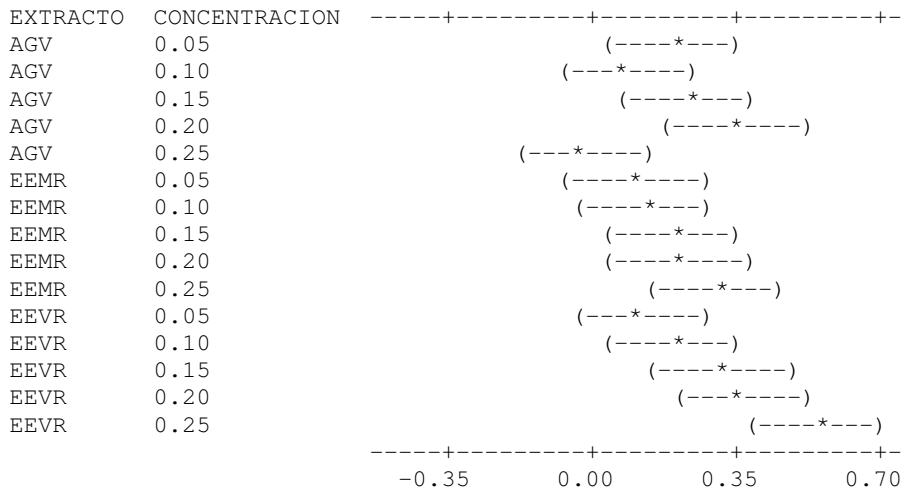
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de

EXTRACTO*CONCENTRACION

EXTRACTO = AGM

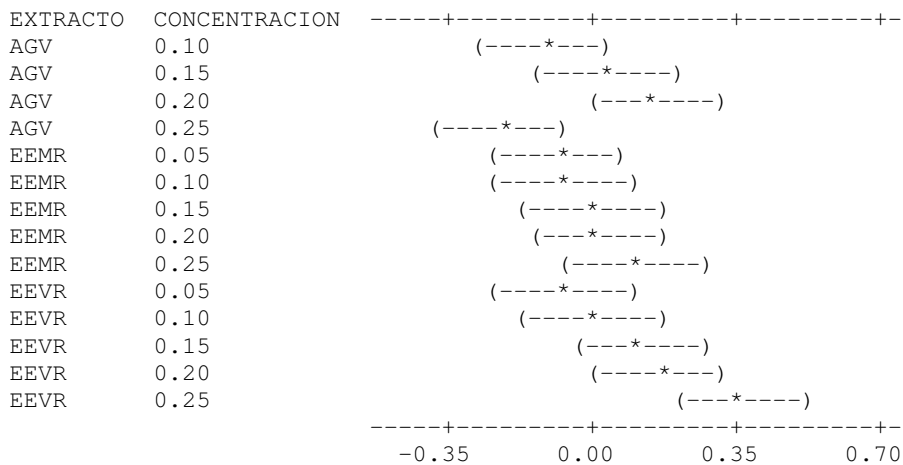
CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
AGM	0.10	-0.0203	0.1433	0.30696
AGM	0.15	-0.0236	0.1400	0.30362
AGM	0.20	-0.1236	0.0400	0.20362
AGM	0.25	-0.2536	-0.0900	0.07362
AGV	0.05	-0.0603	0.1033	0.26696
AGV	0.10	-0.1770	-0.0133	0.15029
AGV	0.15	-0.0236	0.1400	0.30362
AGV	0.20	0.0964	0.2600	0.42362
AGV	0.25	-0.2803	-0.1167	0.04696
EEMR	0.05	-0.1442	0.0194	0.18306
EEMR	0.10	-0.1258	0.0378	0.20146
EEMR	0.15	-0.0595	0.1041	0.26776
EEMR	0.20	-0.0480	0.1157	0.27929
EEMR	0.25	0.0450	0.2087	0.37229
EEVR	0.05	-0.1313	0.0323	0.19596
EEVR	0.10	-0.0586	0.1050	0.26866

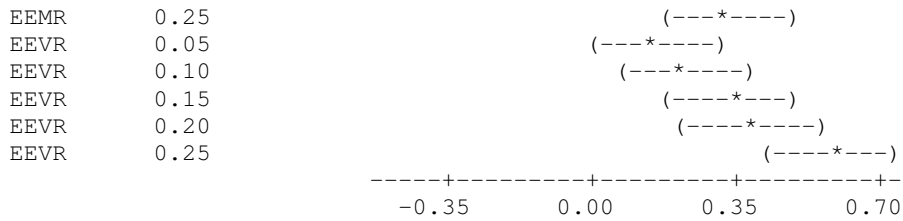


EXTRACTO = AGV
 CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
AGV	0.10	-0.2803	-0.1167	0.04696
AGV	0.15	-0.1270	0.0367	0.20029
AGV	0.20	-0.0070	0.1567	0.32029
AGV	0.25	-0.3836	-0.2200	-0.05638
EEMR	0.05	-0.2475	-0.0839	0.07972
EEMR	0.10	-0.2291	-0.0655	0.09812
EEMR	0.15	-0.1628	0.0008	0.16442
EEMR	0.20	-0.1513	0.0123	0.17596
EEMR	0.25	-0.0583	0.1053	0.26896
EEVR	0.05	-0.2346	-0.0710	0.09262
EEVR	0.10	-0.1619	0.0017	0.16532
EEVR	0.15	-0.0463	0.1173	0.28092
EEVR	0.20	0.0025	0.1661	0.32972
EEVR	0.25	0.1945	0.3581	0.52172

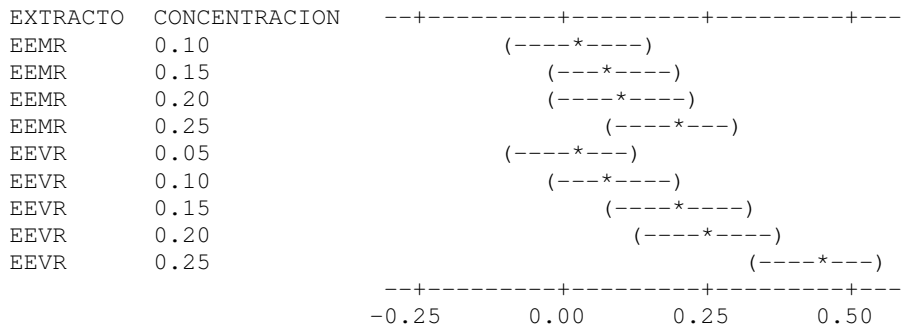


EXTRACTO = AGV
 CONCENTRACION = 0.10 restado a:



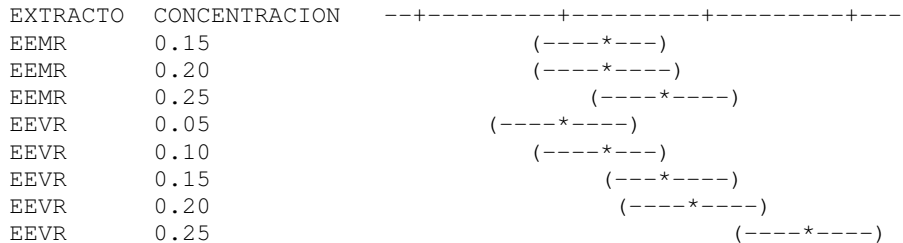
EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.05 restado a:

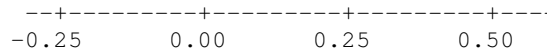
EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEMR	0.10	-0.1009	0.01840	0.1377
EEMR	0.15	-0.0346	0.08470	0.2040
EEMR	0.20	-0.0231	0.09623	0.2155
EEMR	0.25	0.0699	0.18923	0.3085
EEVR	0.05	-0.1064	0.01290	0.1322
EEVR	0.10	-0.0337	0.08560	0.2049
EEVR	0.15	0.0819	0.20120	0.3205
EEVR	0.20	0.1307	0.25000	0.3693
EEVR	0.25	0.3227	0.44200	0.5613



EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.10 restado a:

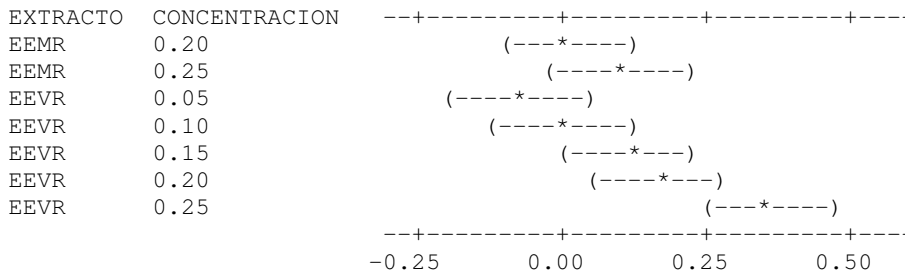
EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEMR	0.15	-0.0530	0.066300	0.1856
EEMR	0.20	-0.0415	0.077833	0.1971
EEMR	0.25	0.0515	0.170833	0.2901
EEVR	0.05	-0.1248	-0.005500	0.1138
EEVR	0.10	-0.0521	0.067200	0.1865
EEVR	0.15	0.0635	0.182800	0.3021
EEVR	0.20	0.1123	0.231600	0.3509
EEVR	0.25	0.3043	0.423600	0.5429





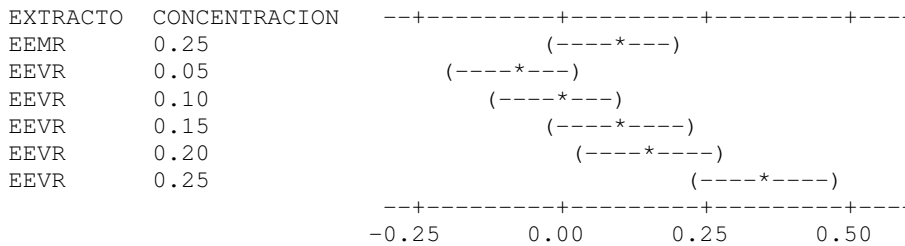
EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.15 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEMR	0.20	-0.1078	0.01153	0.13084
EEMR	0.25	-0.0148	0.10453	0.22384
EEVR	0.05	-0.1911	-0.07180	0.04751
EEVR	0.10	-0.1184	0.00090	0.12021
EEVR	0.15	-0.0028	0.11650	0.23581
EEVR	0.20	0.0460	0.16530	0.28461
EEVR	0.25	0.2380	0.35730	0.47661



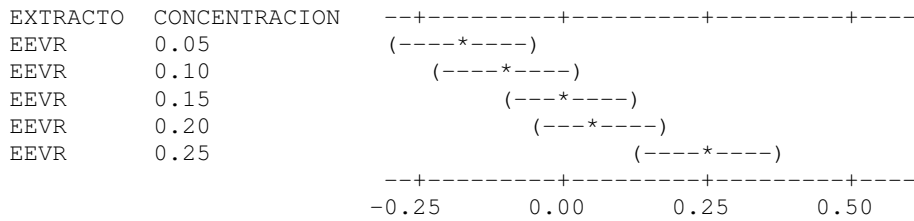
EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.20 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEMR	0.25	-0.0263	0.09300	0.21231
EEVR	0.05	-0.2026	-0.08333	0.03598
EEVR	0.10	-0.1299	-0.01063	0.10868
EEVR	0.15	-0.0143	0.10497	0.22428
EEVR	0.20	0.0345	0.15377	0.27308
EEVR	0.25	0.2265	0.34577	0.46508



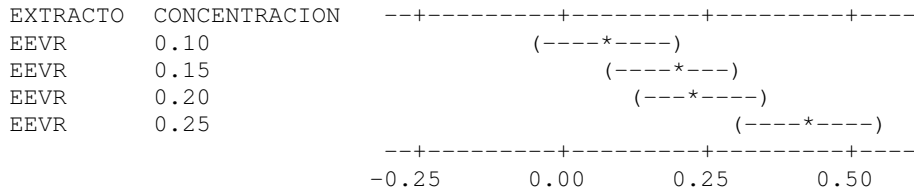
EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.25 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEVR	0.05	-0.2956	-0.1763	-0.05702
EEVR	0.10	-0.2229	-0.1036	0.01568
EEVR	0.15	-0.1073	0.0120	0.13128
EEVR	0.20	-0.0585	0.0608	0.18008
EEVR	0.25	0.1335	0.2528	0.37208



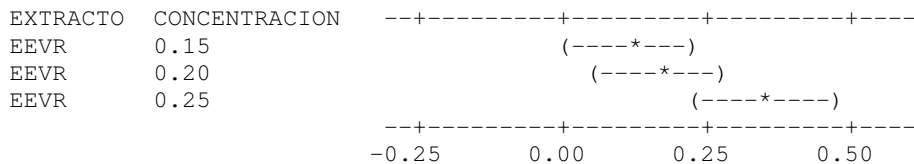
EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEVR	0.10	-0.04661	0.07270	0.1920
EEVR	0.15	0.06899	0.18830	0.3076
EEVR	0.20	0.11779	0.23710	0.3564
EEVR	0.25	0.30979	0.42910	0.5484



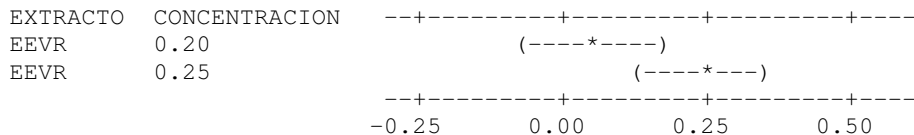
EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.10 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEVR	0.15	-0.003709	0.1156	0.2349
EEVR	0.20	0.045091	0.1644	0.2837
EEVR	0.25	0.237091	0.3564	0.4757



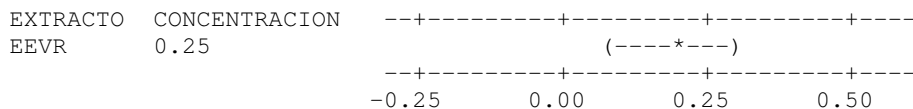
EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.15 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEVR	0.20	-0.07051	0.04880	0.1681
EEVR	0.25	0.12149	0.24080	0.3601



EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.20 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Inferior	Centrada	Superior
EEVR	0.25	0.07269	0.1920	0.3113



Pruebas simultáneas de Tukey

Variable de respuesta % DE INHIBICION

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de

EXTRACTO*CONCENTRACION

EXTRACTO = AGM

CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGM	0.10	0.1433	0.04317	3.320	0.1489
AGM	0.15	0.1400	0.04317	3.243	0.1750
AGM	0.20	0.0400	0.04317	0.927	1.0000
AGM	0.25	-0.0900	0.04317	-2.085	0.8455
AGV	0.05	0.1033	0.04317	2.394	0.6626
AGV	0.10	-0.0133	0.04317	-0.309	1.0000
AGV	0.15	0.1400	0.04317	3.243	0.1750
AGV	0.20	0.2600	0.04317	6.022	0.0001
AGV	0.25	-0.1167	0.04317	-2.702	0.4540
EEMR	0.05	0.0194	0.04317	0.450	1.0000
EEMR	0.10	0.0378	0.04317	0.876	1.0000
EEMR	0.15	0.1041	0.04317	2.412	0.6502
EEMR	0.20	0.1157	0.04317	2.679	0.4692
EEMR	0.25	0.2087	0.04317	4.833	0.0028
EEVR	0.05	0.0323	0.04317	0.749	1.0000
EEVR	0.10	0.1050	0.04317	2.433	0.6361
EEVR	0.15	0.2206	0.04317	5.111	0.0013
EEVR	0.20	0.2694	0.04317	6.241	0.0001
EEVR	0.25	0.4614	0.04317	10.688	0.0001

EXTRACTO = AGM

CONCENTRACION = 0.10 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGM	0.15	-0.0033	0.04317	-0.077	1.0000
AGM	0.20	-0.1033	0.04317	-2.394	0.6626
AGM	0.25	-0.2333	0.04317	-5.405	0.0005
AGV	0.05	-0.0400	0.04317	-0.927	1.0000
AGV	0.10	-0.1567	0.04317	-3.629	0.0739
AGV	0.15	-0.0033	0.04317	-0.077	1.0000
AGV	0.20	0.1167	0.04317	2.702	0.4540
AGV	0.25	-0.2600	0.04317	-6.022	0.0001
EEMR	0.05	-0.1239	0.04317	-2.870	0.3505
EEMR	0.10	-0.1055	0.04317	-2.444	0.6288
EEMR	0.15	-0.0392	0.04317	-0.908	1.0000
EEMR	0.20	-0.0277	0.04317	-0.641	1.0000
EEMR	0.25	0.0653	0.04317	1.513	0.9904
EEVR	0.05	-0.1110	0.04317	-2.571	0.5418
EEVR	0.10	-0.0383	0.04317	-0.887	1.0000
EEVR	0.15	0.0773	0.04317	1.791	0.9514

EEVR	0.20	0.1261	0.04317	2.921	0.3218
EEVR	0.25	0.3181	0.04317	7.368	0.0001

EXTRACTO = AGM
 CONCENTRACION = 0.15 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGM	0.20	-0.1000	0.04317	-2.316	0.7131
AGM	0.25	-0.2300	0.04317	-5.328	0.0007
AGV	0.05	-0.0367	0.04317	-0.849	1.0000
AGV	0.10	-0.1533	0.04317	-3.552	0.0887
AGV	0.15	-0.0000	0.04317	-0.000	1.0000
AGV	0.20	0.1200	0.04317	2.780	0.4048
AGV	0.25	-0.2567	0.04317	-5.945	0.0001
EEMR	0.05	-0.1206	0.04317	-2.793	0.3966
EEMR	0.10	-0.1022	0.04317	-2.367	0.6805
EEMR	0.15	-0.0359	0.04317	-0.831	1.0000
EEMR	0.20	-0.0243	0.04317	-0.564	1.0000
EEMR	0.25	0.0687	0.04317	1.591	0.9840
EEVR	0.05	-0.1077	0.04317	-2.494	0.5946
EEVR	0.10	-0.0350	0.04317	-0.810	1.0000
EEVR	0.15	0.0806	0.04317	1.868	0.9309
EEVR	0.20	0.1294	0.04317	2.998	0.2810
EEVR	0.25	0.3214	0.04317	7.446	0.0001

EXTRACTO = AGM
 CONCENTRACION = 0.20 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGM	0.25	-0.1300	0.04317	-3.011	0.2744
AGV	0.05	0.0633	0.04317	1.467	0.9932
AGV	0.10	-0.0533	0.04317	-1.235	0.9991
AGV	0.15	0.1000	0.04317	2.316	0.7131
AGV	0.20	0.2200	0.04317	5.096	0.0013
AGV	0.25	-0.1567	0.04317	-3.629	0.0739
EEMR	0.05	-0.0206	0.04317	-0.476	1.0000
EEMR	0.10	-0.0022	0.04317	-0.050	1.0000
EEMR	0.15	0.0641	0.04317	1.486	0.9922
EEMR	0.20	0.0757	0.04317	1.753	0.9597
EEMR	0.25	0.1687	0.04317	3.907	0.0371
EEVR	0.05	-0.0077	0.04317	-0.178	1.0000
EEVR	0.10	0.0650	0.04317	1.506	0.9909
EEVR	0.15	0.1806	0.04317	4.184	0.0178
EEVR	0.20	0.2294	0.04317	5.314	0.0007
EEVR	0.25	0.4214	0.04317	9.762	0.0001

EXTRACTO = AGM
 CONCENTRACION = 0.25 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGV	0.05	0.19333	0.04317	4.4783	0.0078
AGV	0.10	0.07667	0.04317	1.7759	0.9547
AGV	0.15	0.23000	0.04317	5.3276	0.0007
AGV	0.20	0.35000	0.04317	8.1072	0.0001

AGV	0.25	-0.02667	0.04317	-0.6177	1.0000
EEMR	0.05	0.10943	0.04317	2.5349	0.5666
EEMR	0.10	0.12783	0.04317	2.9611	0.3001
EEMR	0.15	0.19413	0.04317	4.4968	0.0074
EEMR	0.20	0.20567	0.04317	4.7639	0.0034
EEMR	0.25	0.29867	0.04317	6.9181	0.0001
EEVR	0.05	0.12233	0.04317	2.8337	0.3718
EEVR	0.10	0.19503	0.04317	4.5176	0.0070
EEVR	0.15	0.31063	0.04317	7.1953	0.0001
EEVR	0.20	0.35943	0.04317	8.3257	0.0001
EEVR	0.25	0.55143	0.04317	12.7731	0.0001

EXTRACTO = AGV

CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGV	0.10	-0.1167	0.04317	-2.702	0.4540
AGV	0.15	0.0367	0.04317	0.849	1.0000
AGV	0.20	0.1567	0.04317	3.629	0.0739
AGV	0.25	-0.2200	0.04317	-5.096	0.0013
EEMR	0.05	-0.0839	0.04317	-1.943	0.9058
EEMR	0.10	-0.0655	0.04317	-1.517	0.9902
EEMR	0.15	0.0008	0.04317	0.019	1.0000
EEMR	0.20	0.0123	0.04317	0.286	1.0000
EEMR	0.25	0.1053	0.04317	2.440	0.6314
EEVR	0.05	-0.0710	0.04317	-1.645	0.9777
EEVR	0.10	0.0017	0.04317	0.039	1.0000
EEVR	0.15	0.1173	0.04317	2.717	0.4445
EEVR	0.20	0.1661	0.04317	3.847	0.0431
EEVR	0.25	0.3581	0.04317	8.295	0.0001

EXTRACTO = AGV

CONCENTRACION = 0.10 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGV	0.15	0.1533	0.04317	3.552	0.0887
AGV	0.20	0.2733	0.04317	6.331	0.0001
AGV	0.25	-0.1033	0.04317	-2.394	0.6626
EEMR	0.05	0.0328	0.04317	0.759	1.0000
EEMR	0.10	0.0512	0.04317	1.185	0.9995
EEMR	0.15	0.1175	0.04317	2.721	0.4420
EEMR	0.20	0.1290	0.04317	2.988	0.2861
EEMR	0.25	0.2220	0.04317	5.142	0.0011
EEVR	0.05	0.0457	0.04317	1.058	0.9999
EEVR	0.10	0.1184	0.04317	2.742	0.4286
EEVR	0.15	0.2340	0.04317	5.419	0.0005
EEVR	0.20	0.2828	0.04317	6.550	0.0001
EEVR	0.25	0.4748	0.04317	10.997	0.0001

EXTRACTO = AGV

CONCENTRACION = 0.15 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGV	0.20	0.1200	0.04317	2.780	0.4048

AGV	0.25	-0.2567	0.04317	-5.945	0.0001
EEMR	0.05	-0.1206	0.04317	-2.793	0.3966
EEMR	0.10	-0.1022	0.04317	-2.367	0.6805
EEMR	0.15	-0.0359	0.04317	-0.831	1.0000
EEMR	0.20	-0.0243	0.04317	-0.564	1.0000
EEMR	0.25	0.0687	0.04317	1.591	0.9840
EEVR	0.05	-0.1077	0.04317	-2.494	0.5946
EEVR	0.10	-0.0350	0.04317	-0.810	1.0000
EEVR	0.15	0.0806	0.04317	1.868	0.9309
EEVR	0.20	0.1294	0.04317	2.998	0.2810
EEVR	0.25	0.3214	0.04317	7.446	0.0001

EXTRACTO = AGV
 CONCENTRACION = 0.20 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
AGV	0.25	-0.3767	0.04317	-8.725	0.0001
EEMR	0.05	-0.2406	0.04317	-5.572	0.0003
EEMR	0.10	-0.2222	0.04317	-5.146	0.0011
EEMR	0.15	-0.1559	0.04317	-3.610	0.0773
EEMR	0.20	-0.1443	0.04317	-3.343	0.1417
EEMR	0.25	-0.0513	0.04317	-1.189	0.9995
EEVR	0.05	-0.2277	0.04317	-5.274	0.0008
EEVR	0.10	-0.1550	0.04317	-3.590	0.0812
EEVR	0.15	-0.0394	0.04317	-0.912	1.0000
EEVR	0.20	0.0094	0.04317	0.219	1.0000
EEVR	0.25	0.2014	0.04317	4.666	0.0046

EXTRACTO = AGV
 CONCENTRACION = 0.25 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEMR	0.05	0.1361	0.04317	3.153	0.2100
EEMR	0.10	0.1545	0.04317	3.579	0.0833
EEMR	0.15	0.2208	0.04317	5.114	0.0012
EEMR	0.20	0.2323	0.04317	5.382	0.0006
EEMR	0.25	0.3253	0.04317	7.536	0.0001
EEVR	0.05	0.1490	0.04317	3.451	0.1117
EEVR	0.10	0.2217	0.04317	5.135	0.0012
EEVR	0.15	0.3373	0.04317	7.813	0.0001
EEVR	0.20	0.3861	0.04317	8.943	0.0001
EEVR	0.25	0.5781	0.04317	13.391	0.0001

EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEMR	0.10	0.01840	0.03368	0.5463	0.9999
EEMR	0.15	0.08470	0.03368	2.5150	0.3177
EEMR	0.20	0.09623	0.03368	2.8574	0.1827
EEMR	0.25	0.18923	0.03368	5.6189	0.0006
EEVR	0.05	0.01290	0.03368	0.3830	1.0000
EEVR	0.10	0.08560	0.03368	2.5417	0.3052
EEVR	0.15	0.20120	0.03368	5.9742	0.0003

EEVR	0.20	0.25000	0.03368	7.4232	0.0000
EEVR	0.25	0.44200	0.03368	13.1242	0.0000

EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.10 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEMR	0.15	0.066300	0.03368	1.9686	0.6276
EEMR	0.20	0.077833	0.03368	2.3111	0.4233
EEMR	0.25	0.170833	0.03368	5.0725	0.0019
EEVR	0.05	-0.005500	0.03368	-0.1633	1.0000
EEVR	0.10	0.067200	0.03368	1.9954	0.6113
EEVR	0.15	0.182800	0.03368	5.4278	0.0009
EEVR	0.20	0.231600	0.03368	6.8769	0.0001
EEVR	0.25	0.423600	0.03368	12.5779	0.0000

EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.15 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEMR	0.20	0.01153	0.03368	0.342	1.0000
EEMR	0.25	0.10453	0.03368	3.104	0.1173
EEVR	0.05	-0.07180	0.03368	-2.132	0.5278
EEVR	0.10	0.00090	0.03368	0.027	1.0000
EEVR	0.15	0.11650	0.03368	3.459	0.0590
EEVR	0.20	0.16530	0.03368	4.908	0.0027
EEVR	0.25	0.35730	0.03368	10.609	0.0000

EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.20 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEMR	0.25	0.09300	0.03368	2.761	0.2151
EEVR	0.05	-0.08333	0.03368	-2.474	0.3373
EEVR	0.10	-0.01063	0.03368	-0.316	1.0000
EEVR	0.15	0.10497	0.03368	3.117	0.1146
EEVR	0.20	0.15377	0.03368	4.566	0.0057
EEVR	0.25	0.34577	0.03368	10.267	0.0000

EXTRACTO = EEMR
 CONCENTRACION = 0.25 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEVR	0.05	-0.1763	0.03368	-5.236	0.0013
EEVR	0.10	-0.1036	0.03368	-3.077	0.1233
EEVR	0.15	0.0120	0.03368	0.355	1.0000
EEVR	0.20	0.0608	0.03368	1.804	0.7257
EEVR	0.25	0.2528	0.03368	7.505	0.0000

EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.05 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEVR	0.10	0.07270	0.03368	2.159	0.5118
EEVR	0.15	0.18830	0.03368	5.591	0.0006
EEVR	0.20	0.23710	0.03368	7.040	0.0001
EEVR	0.25	0.42910	0.03368	12.741	0.0000

EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.10 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEVR	0.15	0.1156	0.03368	3.432	0.0622
EEVR	0.20	0.1644	0.03368	4.881	0.0029
EEVR	0.25	0.3564	0.03368	10.583	0.0000

EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.15 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEVR	0.20	0.04880	0.03368	1.449	0.8965
EEVR	0.25	0.24080	0.03368	7.150	0.0000

EXTRACTO = EEVR
 CONCENTRACION = 0.20 restado a:

EXTRACTO	CONCENTRACION	Diferencia de medias	SE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
EEVR	0.25	0.1920	0.03368	5.701	0.0005

ANEXO 11. TRABAJOS PRESENTADOS:

- a.) Poster: "Caracterización preliminar de la enzima polifenoloxidasa presente en pulpa de borojo (*Borojoa Patinoi Cuatrec*)" (CIBIA 8, 2011).



- b.) Presentación oral: "Caracterización preliminar de la enzima polifenoloxidasa presente en pulpa de Borojó (*Borojoa patinoi cuatrec*)" (V Jornada de socialización 2011, U sabana).



- c.) Presentación oral y artículo: “Oxidative capacity of the enzyme polyphenoloxidase during Borojón ripening (*Borojoa patinoi* Cuatrec)” (II Conferencia Internacional en Manejo Poscosecha y Calidad de Productos Hortícolas de Interés en el Trópico, U. Nacional 2011).

Cambios en la capacidad oxidante de la enzima polifenol oxidasa en la maduración del borojón (*Borojoa Patinoi cuatrec*)

Javier Alexander JIMÉNEZ¹, Luis Eduardo DÍAZ², Luz Indira SOTELO³.

¹Estudiante de Maestría en diseño y gestión de procesos, Universidad de La Sabana.

javierjifo@unisabana.edu.co

²PhD. En Química, Docente Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana,

luisdb@unisabana.edu.co

³PhD. En Ciencia y tecnología de alimentos, Docente Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, indira.sotelo@unisabana.edu.co

Universidad de La Sabana, Grupo de procesos agroindustriales.

Palabras clave: polifenoles, pardeamiento, micro-estructura.

El Borojón (*Borojoa patinoi cuatrec*) es una planta perteneciente a la familia Rubiácea. El fruto en sus primeros estados es verde clara, al madurar se torna parda rojiza presentándose un ablandamiento importante de la pulpa. Las polifenol oxidasas (PFO) en presencia de oxígeno catalizan dos reacciones: la hidroxilación de monofenoles a difenoles y la oxidación de polifenoles a quinonas, los cuales son posteriormente polimerizados en pigmentos oscuros. En este estudio se caracterizó la enzima PFO del Borojón en dos estados de maduración clasificados por la relación entre acidez titulable y grados brix, con el fin de evidenciar el cambio en el contenido de fenoles totales debido a esta enzima y al cambio estructural del fruto; se analizaron micro-estructuralmente los frutos, se determinó la cantidad de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu 750nm con valores mayores para el Borojón verde (284.02±32.19 mg ac. galico/l), se cuantificaron las proteínas utilizando ácidobicinoninico (595 nm) encontrando mayor contenido en el Borojón verde (11.697±0.4 mg/ml de proteína), se visualizaron las cinéticas de pardeamiento empleando como sustrato catecol 100 mM obteniendo constantes de desaparición de sustrato en el Borojón verde con valores de 2.33/min; con estos procedimientos se obtuvieron diferencias conformacionales en las estructuras celulares en los estados de maduración y una elevada actividad de oxidación enzimática en el Borojón verde. Este estudio permitió evidenciar por primera vez la presencia y el efecto que tiene la PFO en el Borojón en estado verde y su baja actividad en estados avanzados de maduración y se demuestra la importancia en investigar acerca de las condiciones óptimas durante la cosecha y almacenamiento con el fin de disminuir la actividad de las PFO y prolongar la vida media de este fruto y la conservación de polifenoles, los cuales poseen un gran interés en aplicaciones industriales.





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE AGRONOMIA-ICTA

Bogotá, Colombia. Noviembre 4 de 2011

La organización de la

II CONFERENCIA INTERNACIONAL EN MANEJO POSCOSECHA Y CALIDAD DE PRODUCTOS HORTÍCOLAS DE INTERÉS EN EL TRÓPICO

Llevada a cabo en Bogotá, Colombia del 2 al 4 de Noviembre de 2011

Certifica que durante el desarrollo del evento se presentó el trabajo titulado

Cambios en la capacidad oxidante de la enzima polifenol oxidasa en la maduración de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec)

AUTORES:

J.A. Jiménez, L.E. Díaz, L.I. Sotelo

En modalidad de presentación oral

Aníbal Herrera
Director ICTA



- d.) Poster: "Inhibition of Hyaluronidase activity by Borojó phenolic extracts (*Borojoa patinoi* Cuatrec) in two ripening stages." (IUFoST 2012).

