

Pror. 7-11-93

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 7 Junio 91
ENTRADA NOM. 2768

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 7 Junio 91
ENTRADA NOM. 2768
T
12
90

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y
BIOLOGIA MOLECULAR

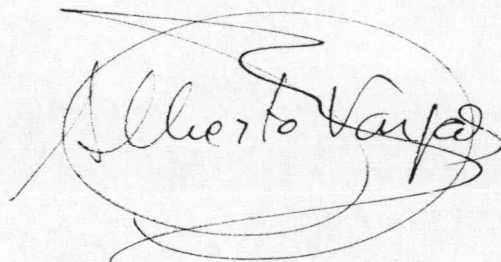
ESTUDIO BIOQUIMICO Y MORFOLOGICO
DE LA MADURACION DE LOS FRUTOS
DEL CHIRIMOYO CONSERVADOS A
BAJAS TEMPERATURAS

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 6965943x
Nº Copia 12 1206168

MARGARITA GUTIERREZ GARCIA
GRANADA. 1991

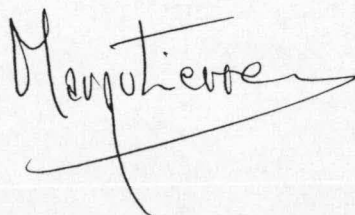
Memoria presentada por la Licenciada Margarita Gutiérrez García para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas, dirigida por el Dr. Alberto M. Vargas Morales.

Director:

A handwritten signature in cursive script, reading "Alberto Vargas", enclosed within a large, loopy circular flourish.

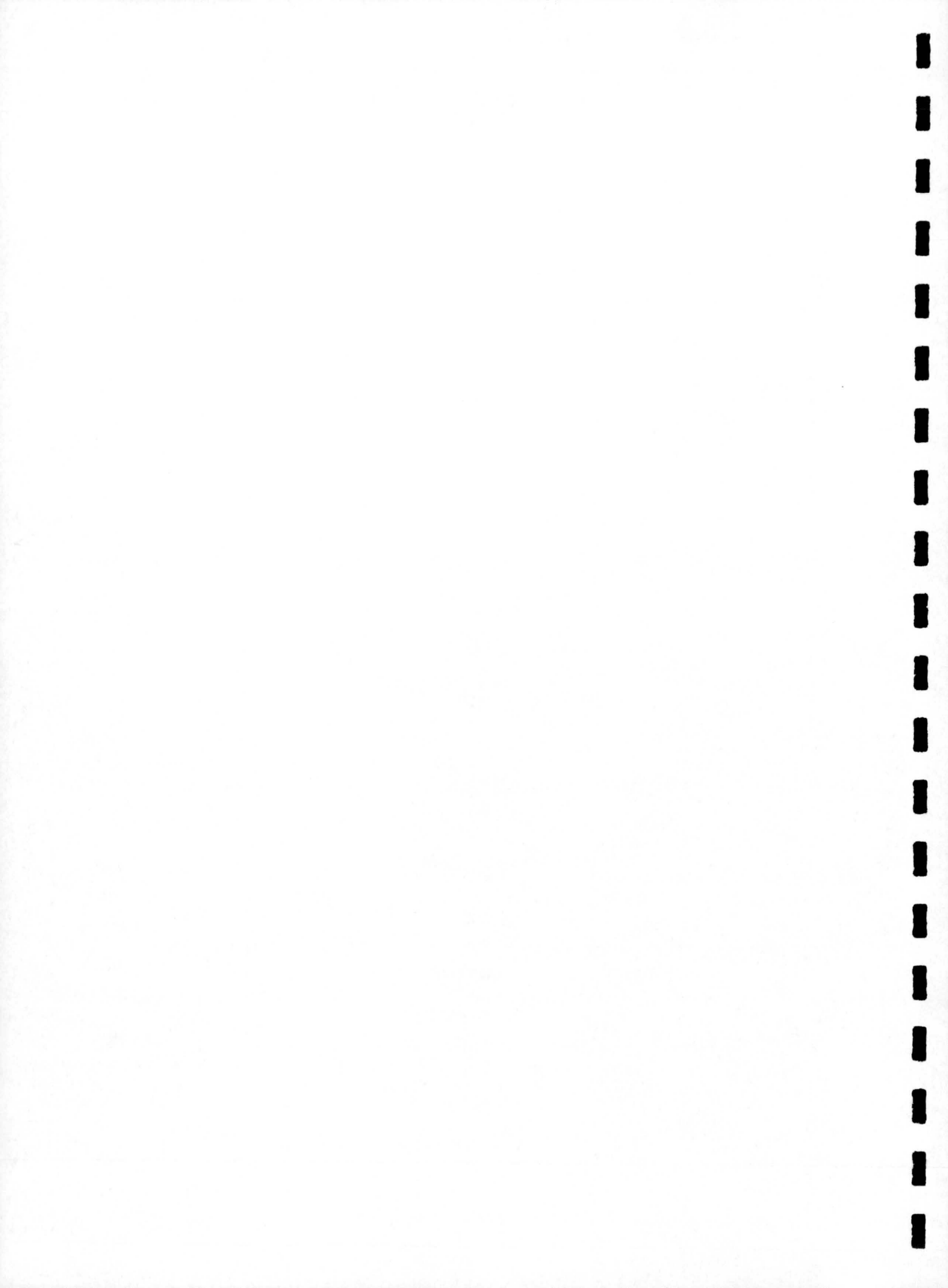
Alberto M. Vargas Morales.

Licenciada:

A handwritten signature in cursive script, reading "Margarita", with a long horizontal stroke extending to the right.

Margarita Gutiérrez García

I. INTRODUCCION



INTRODUCCION

El cultivo del chirimoyo tiene una extraordinaria importancia económica para la provincia de Granada, ya que en sus zonas litorales, fundamentalmente en los valles de los rios Verde y Guadalfeo, se halla perfectamente establecido, llegando a producirse en torno a 30.000 toneladas de fruta al año.

Las chirimoyas son frutos típicamente climatéricos, lo que significa que durante su maduración post-cosecha experimentan un incremento notable en la respiración, que en este caso va seguido muy rápidamente de un proceso acelerado de senescencia. Los frutos tienen un periodo hábil para su consumo que oscila desde 4 o 5 días hasta cerca de dos semanas tras su recogida, dependiendo de las condiciones de conservación, lo que exige unas cadenas de comercialización muy ágiles, para que los frutos lleguen a los consumidores en un tiempo previo al óptimo para su consumo.

En nuestro Departamento se han realizado diversos trabajos para tratar de prolongar la vida comercial de las frutas del chirimoyo, habiéndose probado la mayor parte de los métodos que actualmente se aplican a la conservación de frutos: Atmósferas hipobáricas, atmósferas hipóxicas, trampas de etileno, refrigeración, recubrimiento con ceras, envoltorios de polietileno o polipropileno, entre otros. El único tratamiento que se ha considerado viable para su empleo comercial ha sido la refrigeración de los frutos, ya que en todos los demás casos se presentaban invariablemente diversos tipos de lesiones que modificaban las características organolépticas de los frutos, haciéndolos inadecuados para su consumo.

La refrigeración tampoco es la panacea, ya que estos frutos subtropicales tienen muy poca capacidad para resistir bajas temperaturas, habiéndose demostrado que, dependiendo del periodo de recolección, el almacenamiento a temperaturas inferiores a 10-12°C puede producir lesiones características que se englobarían en lo que se conoce genéricamente en la bibliografía como "chilling injury" o daños producidos por frío.

Han sido propuestos varios mecanismos para explicar las alteraciones bioquímicas y fisiológicas asociadas a los daños por frío.

Aunque pueda ser arriesgado hacer descansar todo el peso de las modificaciones metabólicas inducidas por frío en una única etapa, parece lógico suponer que el desencadenamiento del proceso pueda encontrarse en los cambios que la refrigeración debe producir en las membranas celulares de los frutos.

Las membranas son barreras dinámicas, selectivas, que cumplen un papel fundamental en la regulación de los procesos bioquímicos y fisiológicos. Durante la maduración o envejecimiento normal de los tejidos vegetales se produce una pérdida progresiva de la integridad de las membranas de una forma diferencial, estando descrito que las más sensibles son las tilocoidales cloroplastídicas, mientras que membranas plasmáticas, del retículo endoplásmico y vacuolares, que colectivamente comprenden la fracción microsomal envejecen por diferentes mecanismos.

Existen evidencias de que cambios sutiles en la organización molecular de membranas de tejidos senescentes son responsables de la pérdida ordenada y progresiva de sus funciones y en definitiva de la integridad estructural. Ha sido descrito que en membranas senescentes coexisten una mezcla de dominios en fase líquida y en fase cristalina o de gel que contribuyen a la producción de poros y a la pérdida de la compartimentación intracelular.

Las transiciones de fase de líquido a gel se deben producir por alteraciones en la composición fosfolipídica de las membranas, modificaciones en la relación esterol/fosfolípidos y/o por cambios en la composición de los ácidos grasos constituyentes de los fosfolípidos. Todos estos cambios han sido descritos para diferentes tejidos vegetales durante la senescencia, en concreto, en tejidos que presentan incrementos climatéricos en la producción de etileno se ha visto una disminución en la fluidez de membrana, coincidente o inmediatamente anterior al pico de etileno.

Cabe también destacar el papel descrito para la peroxidación de lípidos inducida por radicales libres durante la senescencia. Este proceso produciría alteraciones en la integridad de las bicapas lipídicas, favoreciendo de este modo la acción de las fosfolipasas y todo el remodelado de las membranas coadyuvando, a la pérdida de la permeabilidad selectiva de las mismas.

Todos estos cambios en las membranas de los frutos carnosos, acompañados de la disolución por digestión enzimática de las paredes

celulares y de los polisacáridos de reserva producen, en definitiva, el reblandecimiento de la pulpa dentro de un patrón fisiológico que facilita la liberación de las semillas.

Cuando los frutos son almacenados a temperaturas inferiores a aquellas para las que están genéticamente condicionados, debe ocurrir en primer lugar una brusca transición de fase en las membranas celulares con formación de canales o poros que alteren por completo la permeabilidad de las mismas. El cambio en la fluidez de las membranas debe reflejarse en modificaciones en la actividad de enzimas ligadas a membrana y, sobre todo, en una alteración del balance iónico. Ambos aspectos conjuntamente deben producir una disminución en la carga energética celular, acumulación de metabolitos tóxicos al incrementarse los procesos bioquímicos fermentativos y, en definitiva, lesiones celulares y tisulares que pueden conducir a la muerte.

Tanto la maduración en condiciones normales como a bajas temperaturas coinciden en la existencia de modificaciones en la permeabilidad de membranas. Sin embargo, mientras que el proceso natural está controlado genéticamente, con expresión programada de diferentes genes que llevan al proceso normal de senescencia, la maduración a bajas temperaturas no permite posiblemente la expresión correcta del mensaje genético, por lo que los frutos no llegan a alcanzar sus apreciadas características organolépticas.

Es conveniente hacer una diferenciación clara entre los términos senescencia y envejecimiento, aplicados a los tejidos vegetales. De acuerdo con la más reciente literatura, la senescencia puede ser considerada como el conjunto de modificaciones degenerativas que, controladas endógenamente mediante cambios en la expresión genética, llevan a la muerte de las células, tejidos, órganos u organismos, tratándose en definitiva de un proceso de desarrollo natural, que puede ser considerado como una diferenciación terminal. Por el contrario, el envejecimiento debe ser considerado como un amplio conjunto de procesos degenerativos inducidos por factores externos y, por consiguiente, no contemplados en el patrón genético de desarrollo, que se producen como consecuencia de lesiones que se van acumulando con el transcurso del tiempo. El envejecimiento por sí mismo, no lleva necesariamente a la muerte celular, pero puede disminuir la resistencia de las células al estrés incrementando, por tanto, la probabilidad de muerte.

La maduración natural de los frutos del chirimoyo debe, por tanto, ser considerada como un proceso de senescencia. Sin embargo, las manipulaciones externas de los mismos pueden inducir fenómenos de envejecimiento. En este trabajo se ha considerado que la maduración en el laboratorio a una temperatura controlada de 22°C o de 12°C son procesos senescentes, mientras que la conservación a temperaturas inferiores desencadenan procesos de envejecimiento.

El objetivo de esta Tesis ha sido el estudio, en una primera aproximación, de los daños inducidos por frío en los frutos de chirimoyo. Se ha seleccionado la variedad "Fino de Jete" por ser la más profusamente cultivada, con notables diferencias, en la zona de producción española. Las chirimoyas eran transportadas al laboratorio en un plazo de horas después de su recogida del árbol y se almacenaban a varias temperaturas durante periodos de tiempo diferentes.

Se han realizado estudios sobre el contenido glucídico, actividades de algunos enzimas implicados en el metabolismo de radicales libres y sobre la composición lipídica del mesocarpio de los frutos a lo largo de la maduración producida a las diferentes temperaturas de conservación. También se han realizado estudios detallados de algunas lesiones típicas que aparecen en los frutos en respuesta al almacenamiento a bajas temperaturas.

Finalmente se ha realizado un estudio microscópico en tejidos de frutos madurados en condiciones normales y a bajas temperaturas, con el objetivo de encontrar las modificaciones a nivel tisular y celular producidas durante la maduración normal y, sobre todo, en los tejidos lesionados.

Hemos podido concluir que durante la maduración se produce una degradación masiva del almidón, polisacárido de reserva que se encuentra en gran cantidad en el mesocarpio de los frutos recién recolectados, que se transforma en monosacáridos, fundamentalmente glucosa y fructosa. Este proceso se ve bloqueado cuando los frutos se almacenan a bajas temperaturas. Se han encontrado también grandes modificaciones en el metabolismo lipídico, con importantes alteraciones en la composición de fosfolípidos durante la maduración y aparición de especies moleculares lipídicas durante el almacenamiento en frío, que no se producen en circunstancias normales.

El estudio microscópico de los frutos durante su maduración ha permitido confirmar la degradación de las paredes celulares y del

almidón, así como la destrucción de los sistemas de membrana. Se han encontrado graves alteraciones morfológicas cuando los frutos sufren daños por frío.

Este trabajo debe abrir nuevas vias de investigación sobre la aparición de estas lesiones, que puedan llegar a dilucidar los mecanismos moleculares causantes de las mismas, permitiendo de este modo una aproximación más racional al problema de la conservación de los frutos, que en última instancia favorezca la distribución comercial de estos preciados productos sin merma en su calidad.



II. ANTECEDENTES



II. ANTECEDENTES

II.1. MADURACION DE FRUTOS CLIMATERICOS

La maduración de los frutos, especialmente de aquellos de importancia económica, es un tema que ha sido ampliamente revisado en numerosas ocasiones (Jerie et al., 1978; Hobson, 1979; Marriot, 1980; Rhodes, 1980; Friend y Rhodes, 1981; Grierson et al., 1981; Solomos, 1983; Brady, 1987; Noodén y Leopold, 1988).

II.1.1. HORMONAS VEGETALES Y MADURACION

La asociación del etileno con la maduración de los frutos data de 1934, año en el que se publicó la producción de la hormona por manzanas maduras (Gane, 1934). Actualmente existe una clara evidencia que implica al etileno en la inducción de la maduración en los frutos (Burg y Burg, 1962), produciendo cambios en la velocidad de respiración, en la permeabilidad de membranas, destrucción de clorofila y síntesis de otros pigmentos, ablandamiento de los frutos, cambios en el metabolismo de carbohidratos, ácidos orgánicos y proteínas y el desarrollo de aromas característicos de cada fruto (Sacher, 1973; Mattoo et al., 1975).

La producción de etileno es aparentemente autocatalítica (Burg y Burg, 1967) existiendo dos sistemas productores diferentes (McMurchie et al., 1972). El sistema I operaría siempre a baja velocidad en frutos no-climatéricos y en frutos climatéricos hasta la inducción del sistema II, responsable del climaterio (McMurchie et al., 1972; Hoffman y Yang, 1980). Ha sido sugerido que la inducción autocatalítica de la producción de etileno puede ser consecuencia de una modificación en la resistencia a la hormona por alteraciones en la organización celular (Solomos y Laties, 1973) que eliminaría la existencia de controles restrictivos previos. En este sentido cabe destacar el hecho de que los aguacates no maduran mientras permanecen ligados al árbol (Biale y Young, 1971), lo que hizo emerger el concepto de un inhibidor de la maduración producido por el árbol.

Más recientemente ha sido demostrado que durante el inicio del climaterio se producen incrementos sustanciales en la actividad de

los principales enzimas implicados en el control de la biosíntesis de etileno (Yang y Hoffman, 1984), habiéndose demostrado que la cicloheximida inhibe el incremento en la síntesis (Liu y Hoffman, 1985), por lo que se supone que debe incrementarse la síntesis de algún enzima de la ruta, pero esto no se ha demostrado taxativamente.

La acción del etileno puede ser modificada actuando sobre su síntesis o sobre sus receptores en los tejidos vegetales. La plata aniónica bloquea aparentemente a los receptores (Veen, 1983; 1985), habiéndose demostrado la inhibición de la maduración en tomates y plátanos (Salveit et al., 1978; Hobson et al., 1984), que no es revertida por tratamientos posteriores con etileno, a diferencia del calcio, que también tiene un efecto inhibitor sobre la maduración, que sí revierte cuando se administra etileno exógeno (Ferguson, 1984; Eaks, 1985).

Ha habido muchos intentos para definir el papel que otros conocidos reguladores del crecimiento en plantas tienen sobre la maduración.

El ácido abscísico normalmente se incrementa durante este proceso (Kitamura et al., 1983; Zhang y Lu, 1983), al igual que en algunas situaciones de estrés, principalmente salino (Wright y Hiron, 1970). Aunque el tratamiento con esta hormona puede acelerar la maduración (Khudairi, 1972; Mizrahi et al., 1975; Majmudar et al., 1981; Zhang y Lu, 1983; Vendrell, 1985), sin embargo, no se ha encontrado una relación consistente entre el contenido en ácido abscísico de los frutos y su estado de maduración o senescencia (Tsay et al., 1984).

Se ha querido implicar a las auxinas como inhibidores de la maduración (Frenkel y Dyck, 1973), aunque la evaluación de esta hipótesis es muy difícil debido a que las auxinas incrementan la producción de etileno y modifican la respuesta tisular al mismo (Yang y Hoffman, 1984).

II.1.2. EXPRESION GENETICA Y MADURACION

El descubrimiento de que en las primeras etapas del climaterio se produce un incremento en la actividad biosintética, dio origen al concepto de que la maduración de los frutos no es más que un proceso

de diferenciación terminal (Richmond y Biale, 1966; 1967).

Actualmente existen fuertes evidencias de que durante la maduración hay un incremento tanto en la síntesis de nueva proteína como en el reciclado de proteína preexistente. Así se han descrito incrementos del enzima málico en peras (Frenkel et al., 1968), de celulasa en aguacate (Christoffersen et al., 1984), de invertasa (Iki et al., 1978) y poligalacturonasa en tomates (Brady et al., 1982; Tucker y Grierson, 1984).

Por técnicas de hibridación se ha demostrado que el RNA mensajero del precursor de la celulasa llega a incrementarse hasta 50 veces durante la maduración de los aguacates (Christoffersen et al., 1984).

En tomates se ha demostrado que 48 horas después de la iniciación de la producción de etileno por el sistema II, se producen cambios en la población de RNAs mensajeros (Speirs et al., 1984). Del estudio de genotecas de cDNA realizadas con RNAs-poli(A⁺) de frutos durante la maduración, se ha deducido que existe una población de RNAs que se incrementa sensiblemente durante la maduración, o bien que es exclusiva de esta etapa (Mansson et al., 1985; Slater et al., 1985).

Estas y otras evidencias implicando inmunodetección de enzimas como la poligalacturonasa (Sato et al., 1984; 1985) permite afirmar que la maduración es un proceso genéticamente controlado, durante el cual y por efecto del etileno y/o otros estímulos se produce un cambio sustancial en la expresión genética de los frutos.

II.1.3. RESPIRACION

La rápida elevación en la intensidad respiratoria que experimentan muchos frutos al comienzo de su maduración, es conocida como climaterio respiratorio (Miller et al., 1953; Pratt y Goeschl 1969; Bennet et al., 1987). El máximo alcanzado en esta elevación marca el fin del climaterio y el inicio del periodo postclimatérico que conduce a la senescencia terminal del fruto (Lyons et al., 1962; Burg y Burg, 1962). El climaterio respiratorio es disparado por la elevación de los niveles tisulares de etileno, bien como consecuencia de un incremento de su síntesis o de la aplicación exógena del gas (Biale et al., 1954; Burg y Burg 1962; Pratt y Goeschl, 1969; Marei

y Crane, 1971; Kato et al., 1977; Vendrell, 1985).

Dos corrientes fundamentales han tratado de relacionar el climaterio respiratorio con otros fenómenos que acompañan a la maduración. Una de ellas proponía que el incremento en la intensidad respiratoria durante el climaterio estaba directamente relacionada con las necesidades anabólicas de la maduración (Richmon y Biale, 1966). Otros autores sostenían que era la primera manifestación del declinar de la compartimentación celular (Blakman y Parija, 1928; Solomos y Laties, 1973). En la actualidad ambas teorías no son enteramente aceptadas, pero no existe ninguna otra que de un modo satisfactorio explique el sentido fisiológico del climaterio (Brady, 1987).

El incremento en la respiración sí parece ser consecuencia de la elevación de los niveles de etileno endógeno. El climaterio va asociado a un incremento del flujo glucolítico, lo que está en concordancia con la elevación en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, así como de las actividades enzimáticas fosfofructoquinasa y piruvato quinasa (Lieberman, 1979; Brady, 1987). El incremento en la intensidad respiratoria conduce a una elevación en los niveles de ATP, que se mantienen a lo largo de todo el periodo climatérico, lo que indica que la energía química producida y acumulada en la célula es superior a las necesidades del tejido.

II.1.4. REACCIONES OXIDATIVAS Y MEMBRANAS DURANTE LA MADURACION.

La integridad de las membranas así como su permeabilidad selectiva debe de mantenerse en los frutos que presentan un avanzado estado de maduración (Brady 1987). Esta sugerencia está apoyada en el hecho de que durante el climaterio se sintetizan enzimas hidrolíticos y que esta síntesis continúa a lo largo de la maduración. Para que esto sea posible es preciso que exista un sistema ribosomal funcional. De hecho se han encontrado polisomas de frutos maduros (Speris et al., 1984; Tucker y Laties, 1984). Además es preciso que exista un equilibrio iónico adecuado para mantener la estabilidad de los polisomas, lo que sólo puede ser posible si el plasmalema y el tonoplasto no tienen alterada su permeabilidad. Estudios ultraestructurales en aguacates y tomates corroboran esta conclusión (Platt-Aloia y Thomson, 1981; Themmer et al. 1982). No obstante, sí pueden producirse cambios en la estructura de las mitocondrias, del retículo endoplásmico y del plasmalema durante la maduración,

cambios que van asociados con otros sucesos que ocurren en la maduración como el transporte o exportación de los enzimas hidrolíticos de la pared.

En otros estudios estructurales, en cambio, sí se sugiere una perturbación de la funcionalidad de la membrana en células senescentes (Ben-Aire *et al.*, 1979).

En lo que se refiere al comportamiento de los lípidos de membrana a lo largo de la maduración, se han realizado numerosos estudios que tratan de correlacionar la permeabilidad de membrana con la variación que experimentan los lípidos. Se ha encontrado una disminución de lípidos de membrana en tomate (Kalra y Brooks, 1973), disminución del contenido en fosfolípidos (Lurie y Ben-Aire, 1983), incremento de fosfatidilcolina en manzanas maduras (Bartley, 1984), que es uno de los fosfolípidos mayoritarios de las membranas y, por último, en bananas se detecta un incremento en el grado de insaturación en los componentes lipídicos constituyentes de las membranas (Wade y Bishop, 1978).

En tejidos de flores y hojas senescentes los cambios en la fluidez van acompañados con un incremento en lípidos neutros, esteroides, ácidos grasos libres o hidroperóxidos, no produciéndose cambios en las clases de fosfolípidos (Barber y Thompson, 1983; Dhindsa *et al.*, 1981). Igualmente durante la maduración de los tomates se ha visto que se incrementan los peróxidos lipídicos (Frenkel y Eskin, 1977), así como en peras se eleva el peróxido de hidrógeno. Sin embargo de todos estos resultados no se puede obtener una conclusión definitiva, ya que no se tienen en cuenta los efectos de un aumento de permeabilidad mediante modificaciones en el transporte activo u otros medios (Brady 1987).

En cualquier caso ninguno de los cambios observado sugiere que durante la maduración se produzca una gran desorganización en la compartimentación celular, pero sí se observa durante este proceso una tendencia a disminuir la permeabilidad de la membrana (Brady, 1987).

La inhibición de la respiración por auxinas (Frenkel y Dick 1973; Vendrell 1969) y la destrucción peroxidativa del ácido indol-3 acético (Kokkinakis y Brooks 1979), han sido propuestas como reguladores de la maduración, pero no existe una evidencia inequívoca que lo pueda confirmar.

La destrucción de la clorofila y la desdiferenciación de los cloroplastos forman parte del proceso de la maduración de muchos frutos, por lo que Matile (1980), ha sugerido que la peroxidasa o la lipoxigenasa puedan estar implicadas en el catabolismo de la clorofila.

Se ha intentado relacionar las reacciones catalizadas por peroxidasa con la síntesis del etileno (Frenkel y Eskin 1977; Frenkel y Mukai 1984) y se ha visto que altas concentraciones de radicales libres inhiben la síntesis de etileno en los frutos (Apelbaum *et al.*, 1981), sin embargo por el momento permanece dudosa la hipótesis de que los radicales libres intervengan directamente en la síntesis del etileno (Yang y Hoffmann 1984). Sin embargo el hecho de que los radicales superóxido estén implicados en reacciones cuyos productos perturban la funcionalidad de la membrana en flores, puede estar relacionado con la maduración de los frutos, dado el paralelismo que se observa entre la respiración climatérica en los tejidos florales y en los frutos, que en ambos casos es provocada por el etileno.

Las citoquininas, que generalmente actúan como agentes antisenescentes, puede que tengan un papel esencial en la eliminación de radicales libres (Lesham, 1984), presuponiendo que éstos estén implicados en la inducción de la senescencia.

II.1.5. PAREDES CELULARES DURANTE LA MADURACION.

En la mayoría de los frutos la maduración va acompañada de cambios en la textura y reblandecimiento del tejido. Las modificaciones en las paredes de las células que constituyen el fruto son la causa más importante del reblandecimiento y por tanto de los cambios en la textura. Tales modificaciones se producen por la acción combinada de varios enzimas degradativos de las paredes (Labavitch, 1981), los cuales pueden ser regulados por la acción del etileno.

La composición y estructura de las paredes de las células vegetales ha sido investigada en varios tejidos vegetales (Albersheim, 1976). Los polímeros de carbohidratos constituidos por celulosa, hemicelulosa y pectinas, representan del 90-95%, siendo el 5-10% restante glicoproteínas. La pared primaria de las células vegetales de todas las plantas superiores contienen el mismo tipo de

polisacáridos aunque en diferentes proporciones (McNeil et al., 1984).

Se ha propuesto un modelo tridimensional para la pared primaria basado en los enlaces entre los diferentes polímeros (Keegtra et al., 1973; Darvill et al., 1980; Ery, 1986). De acuerdo con este modelo, las microfibrillas de celulosa están recubiertas con una capa de hemicelulosa y todo el material fibrilar está embebido en una matriz de polímeros pécticos. La estructura se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre las cadenas de celulosa y hemicelulosa y por uniones covalentes entre la hemicelulosa y las pectinas.

Aunque este modelo es aceptado por la mayoría de los investigadores alguna evidencia ha sido presentada, que sugiere que las uniones de tipo no covalente son predominantes (Monro et al., 1976) y aunque este tipo de enlaces es más débil, el gran número de uniones posibles entre dos cadenas adyacentes explicaría la cohesión entre ellas.

Es aceptado que las paredes celulares de los frutos tengan una estructura tridimensional similar a la de otros tejidos, es decir similar al modelo propuesto por (Keegtra et al., 1973; Darvill et al., 1980; Ery, 1986).

En un análisis de la composición de los monómeros de las paredes celulares de manzana y fresa (Knee y Bartley, 1981) encontraron bajas cantidades de xilosa y manosa y relativamente altos niveles de ácido galacturónico, arabinosa y galactosa. Esto podría indicar que las paredes celulares de los frutos contuviesen más cantidad de material péctico y menos hemicelulosa que otras. La estructura de los polímeros pécticos ha sido estudiada (Knee y Bartley, 1981). Estructuralmente las paredes celulares de los frutos parecen similares a la pared primaria de otros órganos, excepto posiblemente en que siendo ricas en pectina pueden contener mayor proporción de lámina media o pared primaria, lo que es de suma importancia en el reblandecimiento de los frutos.

Estudios ultraestructurales en varios frutos han demostrado que durante la maduración se producen cambios en la pared de las células del fruto. Así, durante la maduración del aguacate, la lámina media comienza a disolverse y las estructuras fibrilares se dispersan (Pesis et al., 1978). En peras la disolución de la lámina media va acompañada de la desintegración del material fibrilar (Ben-Arie

et al., 1979). En tomates también se pierde la lámina media (Crookes and Grierson, 1983). Estos cambios durante la maduración son el resultado de la acción de los enzimas degradativos de la pared. Los tres enzimas implicados en el proceso de reblandecimiento son la Poligalacturonasa, Pectinesterasa y Celulasa.

El reblandecimiento va normalmente acompañado por un incremento en la concentración de polisacáridos pécticos solubles (Bartley y Knee, 1982; Huber, 1983a). El incremento en residuos solubles de ácido urónico es a menudo correlacionado con un incremento en poligalacturonasas especialmente endopoligalacturonasa. En tomates existe evidencia de una disminución en el tamaño de las cadenas solubles de poliurónidos (Huber, 1983b). Aunque las hemicelulosas son normalmente degradadas durante la maduración, la degradación de los poliurónidos no es dependiente de los cambios en los componentes de hemicelulosa (Huber, 1983b). En tomates también existe una razonable correlación entre la cantidad de poligalacturonasa, la velocidad de reblandecimiento y la degradación de pectina (Brady et al., 1982; 1983; 1985; Hobson, 1980), no obstante la información sobre las pectinas permanece siendo escasa.

En tomates se produce una aparición secuencial de dos isoenzimas de poligalacturonasa (PG-I y PG-II), durante la maduración (Pressey et al., 1973). Su papel no está todavía claro (Baldwin y Pressey, 1988), se sabe no obstante que la PG-I aparece en un estado temprano de la maduración, mientras que la PG-II se incrementa cuando ésta avanza (Brady et al., 1985). La PG-II es capaz de inducir la producción de etileno, siendo este efecto, a su vez, potenciado por la acción de la pectin-metil-esterasa (Baldwin y Pressey, 1988).

Existe también una correlación en aguacates (Awad y Young, 1979; Platt-Aloia et al., 1980), peras (Ben-Aire et al., 1979) y tomates (Crookes y Grierson, 1983) entre la aparición de la actividad poligalacturonasa en la maduración y la pérdida de densidad electrónica de la lámina media. En otros frutos hay una correlación entre la aparición de endo-poligalacturonasa y el comienzo del reblandecimiento (Huber, 1983a; Mowlah y Itoo, 1983; Paull y Chen, 1983; Paull y Deputy, 1983).

Un incremento de las pectinas solubles no evidencia la actividad endo-poligalacturonasa, puesto que esto puede ser debido a la acción de otros enzimas, cambios en los ácidos orgánicos, con variación del pH en las paredes celulares. En manzanas (Bartley y

Knee, 1982) y fresas (Huber, 1984) aumenta la solubilidad de las pectinas, sin detectarse actividad endo-poligalacturonasa.

En el caso de los tomates, simultáneamente con el reblandecimiento del fruto se produce una descomposición de la clorofila y desarrollo de licopeno; todos estos hechos se producen durante la respiración climatérica (Grierson y Tucker, 1983; Kudairi 1972). Se ha visto que estos fenómenos son dependientes del etileno, tanto para su iniciación, como para su posterior desarrollo (Jeffery et al., 1984; Mizrahi 1975). En tomates, el etileno induce la síntesis de poligalacturonasa y de licopeno (Grierson y Tucker, 1983).

Se ha detectado un incremento en la actividad poligalacturonasa antes de que tenga lugar la respiración climatérica (Pooviah et al., 1979), por lo que se ha sugerido que este enzima podría desempeñar un papel clave en la iniciación del proceso de maduración (Tigchelaar, 1978).

Se ha encontrado peptinesterasa en una gran variedad de frutos. Al contrario de lo que sucede con la poligalacturonasa se encuentra en grandes cantidades en frutos no maduros y el incremento de su actividad, durante la maduración, es muy pequeño comparado con el de la poligalacturonasa. Se ha calculado que los niveles de peptinesterasa encontrados en algunos tejidos del fruto serían capaces de desesterificar las pectinas ácidas, en cuestión de minutos (Brady et al., 1976).

Las informaciones que se tienen sobre los cambios en la actividad peptinesterasa durante la maduración son a veces contradictorias. Así, se ha encontrado un aumento de la actividad durante la maduración de las bananas (Hultin y Levine, 1965), de los tomates (Buescher y Tigchelaar, 1975; Tucker et al., 1982) y fresas (Barnes y Patchett, 1976) mientras que permanece constante en bananas (Palmer, 1971; Brady, 1976), tomates (Sawamura et al., 1978), y mangos (Ashraf et al., 1981) o que decrece en tomates (Pressey y Avants, 1972), aguacates (Pressey, 1978), y mangos (Roe y Bruemmer, 1981). La acción de inhibidores fenólicos puede justificar, aunque sólo en parte, estas variaciones (Brady, 1976). La actividad peptinesterasa en tomates puede ser separada en cuatro formas isoenzimáticas (Pressey y Avants, 1972; Tukey et al., 1982) una de las cuales ha sido recientemente secuenciada (Markovic y Jornvall, 1986). Durante la maduración, la proporción de dos de estos isoenzimas varía y un cambio semejante se observa en los mutantes nr (Tucker et al.,

1982), por esto un papel directo de la pectinesterasa en el reblandecimiento es improbable. El enzima puede actuar para desesterificar las pectinas ácidas antes de que intervenga la poligalacturonasa. Por otra parte, la pectinesterasa puede estar implicada en el control del metabolismo de la pared estableciendo cargas en la superficie que participen en equilibrios de Donnan en la superficie celular (Richard y Nout, 1986).

Se ha encontrado actividad celulasa en gran variedad de frutos, pero no se ha detectado ni en peras (Ahmed y Labavitch, 1980), ni en manzanas (Bartley, 1976). El nivel de actividad celulasa crece con la maduración (Bartley y Knee, 1982; Huber, 1983a). Sin embargo, los niveles finales de actividad difieren mucho de unos frutos a otros. Así los niveles de actividad celulasa encontrados en tomates son muy bajos, especialmente si se comparan con los niveles presentes de poligalacturonasa (Hobson, 1982), mientras que en aguacate la actividad celulasa es mucho más alta que la poligalacturonasa (Awad y Young, 1979). La importancia de la celulasa en el reblandecimiento de los tomates ha sido cuestionada, ya que en mutantes *rin*, los cuales no reblandecen, se ha encontrado que contienen niveles de actividad celulasa próximos a los normales (Buescher y Tigchelaar, 1975).

La actividad celulasa consta de dos formas isoenzimáticas. Sólo una de ellas parece estar implicada en la degradación de la pared durante la abscisión (Reid et al., 1974). También se ha descrito la presencia de varios isoenzimas de celulasa en aguacate (Tucker et al., 1985), pero no se ha investigado la importancia de éstos durante la maduración.

Han sido descritas otras glicoxidasas, como la xilanasa en paredes de papaya (Paul y Chen, 1983), que se incrementa durante la maduración, pero no se ha determinado si está implicada en el fenómeno de reblandecimiento. En tomates los mutantes *rin* y *nor* se han empleado para distinguir los cambios observados en las paredes asociados específicamente con la maduración, de los que pueden tener lugar en el envejecimiento (Mizrahi et al., 1975; Frenkel y Garrison, 1976; Tigchelaar et al., 1978).

De qué manera contribuye exactamente la celulasa en el proceso de reblandecimiento y cuál es su sustrato en las paredes no ha sido definido.

Aunque es poco probable que la hidrólisis de la pared tenga un

papel iniciador en la maduración de los frutos climatericos (Tigche-laar et al., 1978), genotipos que reblandecen muy rápidamente maduran muy rápidamente, y los frutos blandos parece que senescen rápidamente. Las interrelaciones entre pared y sucesos intracelulares han sido poco estudiadas. La maduración es considerada, a menudo, como una serie de sucesos independientes, quizás coordinados por el sistema 2 del etileno, pero operando en paralelo. De acuerdo con este punto de vista, la expresión del sistema 2 del etileno, induce entre otros, la síntesis de enzimas hidrolíticos de la pared, los cuales causarían su reblandecimiento. La síntesis y el transporte de tales enzimas desde el citoplasma a la pared van acompañadas de múltiples interacciones entre ambos procesos. Existe, sin embargo, la posibilidad de que el citoplasma esté influenciado por un cambio en el estado físico y químico de la pared. La hidrólisis de la pared parece disminuir la capacidad que tienen de interacción con muchas de proteínas (Hobson et al., 1983), así una consecuencia del reblandecimiento podría ser la liberación, por interacción con el plasmalema, de proteínas previamente inmovilizadas por la pared. Una segunda posibilidad conduciría a la liberación de oligómeros de carbohidratos, los cuales pueden actuar como desencadenando la producción de etileno y otras respuestas de estrés. La producción de etileno indudablemente contribuye a este proceso, pero un efecto de los productos o consecuencias de la degradación de la pared no se ha excluido. Los cambios en las propiedades de la pared modificarían la relación de agua en los tejidos del fruto y contribuiría a la redistribución de solutos en los compartimentos del tejido.

El calcio puede jugar un papel indirecto en la maduración dependiendo de la concentración. Mientras que a bajas concentraciones el calcio interviene sutilmente en la permeabilidad de la membrana y en las proteínas de membrana (Paliyath y Poovaiah, 1985; Paliyath et al., 1984) y actúa como segundo mensajero, altas concentraciones de calcio inhiben la maduración e incluso impiden que ésta tenga lugar, incrementando la dureza de las paredes (Ferguson, 1984) e impidiendo la acción hidrolítica de los enzimas degradativos de las paredes (Brady et al., 1985; Buescher y Hobson 1982), observándose también que elevadas concentraciones de calcio provocan una disminución en la intensidad respiratoria y en los niveles de etileno (Richardson y AL-Ani, 1982). Los intentos que se han realizado para ver cuál es la redistribución del calcio soluble en el espacio entre la vacuola y la pared, no se han llevado a cabo con técnicas muy adecuadas por lo que no se puede adjudicar un papel determinado a este ión en el proceso de la maduración.

II.2. MADURACION DEL FRUTO DEL CHIRIMOYO

De entre todas las especies del género *Annona*, únicamente existen tres que tengan una cierta relevancia desde el punto de vista comercial: *Annona cherimola* Mill., *Annona squamosa* L. y la especie híbrida *A. cherimola* x *A. squamosa*, conocida por atemoya (George y Nissen, 1985). Dentro de ellas existen diferentes variedades botánicas, localizadas muchas de ellas en la colección de la finca "La Mayora", Algarrobo Costa, Málaga, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España.

No son muchos los trabajos científicos publicados sobre la maduración de los frutos de estas especies, a pesar de su indudable importancia. Todos ellos son frutos climatéricos, caracterizados por una maduración muy rápida, que oscila entre los 5 y 8 días, cuando se realiza a 20°C, dependiendo del cultivar (Fuster y Prestamo, 1980). Este no es el único problema derivado de su cultivo, habiéndose realizado diferentes trabajos sobre polinización y cuajado del fruto (Sroeder, 1943; Farré *et al.*, 1976; George y Nissen, 1988; George *et al.*, 1989; George *et al.*, 1990).

Durante la maduración postcosecha de los frutos se produce un notable incremento en la concentración tisular de etileno, consecuencia de una producción incrementada, que coincide con el tercer o cuarto día tras la recogida, acompañada de un incremento en la respiración de los frutos. Paralelamente hay una notable disminución en la textura, que va acompañada de un descenso en los valores de pH del mesocarpio y una acusada elevación en los niveles de azúcares solubles (Lahoz *et al.*, 1991).

Otra característica común del proceso de maduración, que se puede ver incrementada en diversas situaciones ambientales, o por lesiones debidas a golpes o infecciones locales, es el pardeamiento del epicarpio, y en ocasiones del mesocarpio, que hace que el fruto sea menos atractivo para los consumidores. El oscurecimiento es debido a la aparición de pigmentos coloreados originados por la acción de la polifenol oxidasa (Cheftel y Cheftel, 1976), que incrementa su actividad a lo largo de la maduración (Sánchez de Medina *et al.*, 1986).

Se han realizado varios trabajos sobre la actividad del enzima purificado de frutos de la variedad "Fino de Jete" y sobre la acción de diferentes reductores y carboxi-fenoles sobre el mismo (Martínez-

Cayuela et al., 1988a;b;c).

Varios intentos para prolongar la vida comercial de los frutos se han realizado en nuestro Departamento (Sánchez de Medina et al., 1986; Lahoz y Vargas, trabajos no publicados), habiéndose puesto de manifiesto que el almacenamiento de los frutos en cámaras con temperatura, humedad y presión controladas afecta a diversas actividades enzimáticas, al contenido de etileno, textura, sólidos solubles totales y pH. Estas técnicas pueden ser utilizadas para prolongar la etapa de maduración, facilitando de esta forma la comercialización de los frutos. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos producen un retraso en la maduración, que es fuertemente acelerada al retornar el fruto a condiciones atmosféricas y temperaturas de 18-20 °C, produciéndose diferentes fermentaciones y reacciones colaterales que hacen que los frutos no adquieran la calidad óptima para el consumo.

Otros trabajos sobre el control de la maduración de los frutos del chirimoyo se han centrado en la conservación de los mismos en cámaras de atmósfera controlada con diferentes presiones parciales de oxígeno y de anhídrido carbónico (de la Plaza, 1979; Stoll, 1983), llegando a encontrar condiciones que podían retrasar la maduración en torno a una semana, pero produciéndose pérdidas cuantiosas por infecciones fúngicas.

Ha sido demostrado que el empleo de atmósferas controladas no alcanza a prolongar la conservación de los frutos más allá de lo conseguido exclusivamente con la refrigeración a temperaturas de 10°C-12°C (Lahoz et al., 1991; Gutiérrez et al., 1991). Igual ocurre para la conservación de las atemoyas (Batten, 1990).

El retraso en la maduración, conseguido con la disminución de la temperatura, es evidente al estudiar la concentración de etileno tisular. La concentración de esta hormona gaseosa es el resultado de la velocidad en su producción y de la rapidez de difusión a través del mesocarpio y epicarpio hasta la atmósfera. En los frutos madurados a 20 °C la concentración detectada es del orden de décimas de partes por millón (ppm) hasta el tercer día, momento en que comienza a detectarse un incremento notable hasta el día sexto. En frutos almacenados a 10 °C, sin embargo, el incremento en la concentración de etileno no es evidente hasta el día 11, acumulándose la hormona posteriormente en cantidades muy superiores a las del otro grupo experimental (Lahoz et al., 1991).

Actualmente no es posible prolongar la maduración de las chirimoyas más allá de estos límites. Multitud de tratamientos se han mostrado ineficaces. La preservación de los frutos a temperaturas inferiores a las mencionadas previamente produce una maduración anormal y la aparición de lesiones, más o menos reproducibles, que se engloban bajo el término general de daños por frío. Sus manifestaciones en chirimoyas y otros frutos serán revisadas en el siguiente apartado.

II.3. DAÑOS POR FRÍO EN PLANTAS

Las plantas de las regiones tropicales y subtropicales especialmente, aunque también aquellas originarias de zonas templadas, sufren una disfunción fisiológica cuando son expuestas a bajas temperaturas. Este fenómeno es de gran importancia ya que la conservación de los frutos y vegetales a bajas temperaturas es uno de los métodos más comunes para poder retrasar la maduración post-cosecha.

Las plantas sensibles al frío muestran en común una temperatura límite por debajo de la cual se producen los daños, si bien dicha temperatura está por encima del punto de congelación. La tolerancia a la temperatura puede variar para la misma especie dependiendo de la región de origen. El límite de tolerancia está entre 4°C y 0°C para los frutos procedentes de zonas templadas, alrededor de 8°C para frutos subtropicales y de 12°C para frutos típicamente tropicales.

El término comunmente utilizado para describir este fenómeno ha sido el de daños por frío, "chilling injury" y nada tiene que ver con el de daños por congelación.

II.3.1. SINTOMAS

Los síntomas de daños por frío varían dependiendo del tejido y de la severidad alcanzada, aunque las señales de los daños por frío pueden ser visibles en la cámara de conservación, suele ser más aguda tal manifestación cuando los frutos tras ser expuestos a bajas temperaturas son trasladados a temperatura ambiente. La conservación prolongada de tomates por debajo de 12'5°C produce daños por frío (Morris, 1982), sin embargo, los síntomas causados por el daño no

aparecen hasta que son expuestos a una temperatura de alrededor de 20°C (Saltveit et al., 1987).

La evaluación de los daños se realiza de un modo cualitativo a través de los síntomas externos, que en la mayoría de los casos se manifiestan por la aparición de zonas pardeadas o punteaduras en la superficie externa del fruto, además de una pérdida de color. En casos concretos se ha realizado una determinación cuantitativa de la lesión utilizando cambios en la conductividad eléctrica antes de producirse el daño.

Las manifestaciones, visibles en el exterior, de los daños sufridos por los frutos como consecuencia de la conservación a bajas temperaturas más frecuentes son: el picado caracterizado por la aparición de manchas de color marrón, constituidas por pequeñas depresiones en la corteza o piel del fruto, que podría ser debido a la acumulación de compuestos volátiles tóxicos debajo del epicarpio, liberados a través de membranas permeables.

El pardeamiento o escaldadura es otra alteración que consiste en el desarrollo de manchas de color pardo, irregulares y difusas que se extienden más o menos dependiendo de la intensidad del daño. Ha sido descrito en numerosos frutos, entre ellos, la papaya (Harvey, 1988).

La pérdida de color es otro de los síntomas que desarrollan los frutos como respuesta a su intolerancia a las bajas temperaturas en sandías (Showalter 1960).

Las zonas afectadas suelen reblandecerse más rápidamente que el resto del fruto y son así más susceptibles al ataque de microorganismos (Couey, 1982).

II.3.2. SUSCEPTIBILIDAD

La susceptibilidad de los frutos al frío depende de múltiples causas, siendo diferente de unas especies y variedades a otras, y teniendo gran influencia la época en que se ha producido la recolección. Las condiciones climáticas en que se han desarrollado los frutos, las condiciones de cultivo, la posición del fruto en el árbol y la edad fisiológica del fruto, entre otros, son factores que afectan en algún grado la susceptibilidad del fruto al enfriamiento.

Numerosos estudios realizados fundamentalmente en cítricos apoyan la influencia de estos factores (Casas, 1983).

Se ha comprobado también que los frutos tempranos son muy susceptibles al daño por frío y que la tolerancia a las bajas temperaturas aumenta a medida que avanza la madurez. Sin embargo investigaciones más recientes han puesto de manifiesto que la tolerancia a las bajas temperaturas tiene que estar bajo la influencia de otros factores distintos a la madurez (Grierson, 1974; Grierson y Hatton, 1977).

Las variedades precoces y las de recolección en época intermedia son más susceptibles que las tardías (Muñoz-Delgado, 1961; Prattella *et al.*, 1969). Sin embargo, también se ha visto que los pomelos Marsh de principio y fin de temporada son más sensibles al frío que los recolectados en época intermedia (Grierson y Hatton, 1977; Purvis *et al.*, 1979; Purvis y Grierson 1982).

De acuerdo con estos resultados contradictorios se ha sugerido que posiblemente la susceptibilidad al daño por frío pueda estar relacionada con los niveles de reguladores de crecimiento en el árbol en el momento en que se produce la recolección (Grierson, 1974). Se han empleado distintos reguladores de crecimiento benciladenina, ácido giberélico y ácido 2,4-diclorofenoxiacético, realizando tratamientos pre y post-cosecha. Ismail y Grierson, (1977) encontraron que con cualquiera de los reguladores citados se producen modificaciones en la susceptibilidad, pero el sentido y la intensidad del cambio no son consistentes ni predecibles. Posteriormente (Grierson *et al.*, 1982) se ha sugerido que la resistencia a los daños por frío podría ser debida al incremento en los niveles de ácido abscísico, inducido por stress de agua antes o después de la recolección.

El tamaño y la posición de los frutos en el árbol parece que también influyen en la susceptibilidad al daño por frío. Los frutos más pequeños son más susceptibles que los grandes (Smoor *et al.*, 1971). En pomelos se ha comprobado (Purvis, 1980; 1984) que los frutos de la parte más interna del árbol son menos sensibles al frío que los procedentes del exterior, atribuyéndose este comportamiento a posibles diferencias en la composición de los frutos y no como respuesta a la exposición de la luz (Pantastico, 1968; Purvis, 1980), sugiriendo que factores ambientales y bióticos serían los responsables de la mayor o menor susceptibilidad al frío.

II.3.3 DURACION DEL ENFRIAMIENTO

La intensidad de los daños por frío depende no sólo de la temperatura de conservación, sino también del periodo de conservación. En algunos casos los daños pueden revertir cuando son trasvasados después de un periodo de enfriamiento a temperatura ambiente. En otros casos en cambio, el daño es irreversible aunque el periodo de enfriamiento hubiera sido breve.

Se ha comprobado en cítricos que los daños por frío pueden reducirse considerablemente en algunas especies si la conservación a bajas temperaturas se interrumpe con uno o más periodos de temperaturas no dañinas (Davis, 1973; Davis y Hofmann 1973). Este hecho se ha comprobado también en melocotones y nectarinas (Anderson, 1982; Wang y Anderson, 1982), y en patatas (Hruscha *et al.* 1969).

Los daños por frío se ven reducidos en algunos frutos si antes de someterlos a una conservación a bajas temperaturas se mantienen tres o cuatro días a temperatura ambiente (Picha 1986).

II.3.4 MANIFESTACIONES FISIOLOGICAS Y BIOQUIMICAS

La modificación de las corrientes protoplasmicas como consecuencia de la disociación de tubulina, entre otros procesos, es uno de los efectos más espectaculares sufridos por las especies sensibles al frío. Diferentes plantas pueden sufrir este fenómeno a los pocos minutos de ser expuestas a bajas temperaturas, habiéndose observado cómo las especies resistentes no sufren alteraciones al ser sometidas al mismo tratamiento.

El mecanismo de las corrientes protoplasmáticas "protoplasmic streaming" no se conoce exactamente, pero lo que sí está claro, es que el proceso requiere energía y depende de las propiedades físicas del protoplasma y de todos los sistemas subcelulares de membrana (Kamiya, 1962).

Desde hace tiempo se conoce que los microtúbulos de las plantas pueden ser afectados por el frío (Inoue y Sato, 1967). Tanto los filamentos de tubulina (Morejohn y Fosket, 1982) como los de actina (Hochachka y Somero, 1984) se desagregan o disocian por el frío, ya sea su procedencia de animales o de vegetales, ya que existen muchas

similitudes entre ellos (Dawson y Lloyd, 1987).

La asociación de las tubulinas está estabilizada por interacciones hidrofóbicas, que se hacen más débiles conforme se disminuye la temperatura. Está claramente demostrado que existen adaptaciones a la temperatura en el comportamiento de los microtúbulos, disminuyendo la concentración crítica de tubulina en especies adaptadas a vivir a bajas temperaturas (Juniper y Lawton, 1979; Willians et al., 1985).

Igualmente los filamentos de actina son sensibles a las bajas temperaturas (Patterson et al., 1979), estableciéndose grandes diferencias entre especies adaptadas a vivir a bajas temperaturas, en las que no se produce una disrupción tan severa como la que tiene lugar en plantas tropicales (Woods et al., 1984a).

Tanto la actina como la tubulina se asocian a diferentes proteínas que actúan controlando su grado de polimerización. Una de estas proteínas podría ser la calmodulina. Se ha demostrado que el calcio promueve la disociación de los microtúbulos y la detención de los movimientos protoplásmicos (Minorsky, 1985). Una elevación por encima de los niveles normales en citoplasma, del orden de 0,1-1 μ M, podría tener un efecto drástico en la estructuración del citoesqueleto. Debido a que las concentraciones mitocondriales y extracelulares de calcio son del orden de mM, una disminución en la actividad de la ATPasa dependiente de calcio en respuesta a cambios en la temperatura (Caldwell y Haug, 1981) o la apertura de canales de calcio (Hanson et al., 1986) pueden ser responsables de una elevación en los niveles citosólicos de calcio iónico. Se ha demostrado que existe una salida progresiva de calcio en membranas de tomates cuando la temperatura se reduce por debajo de 15°C. Sin embargo en membranas de *Digitalis purpúrea*, adaptada a temperaturas cercanas a 0°C esto no se produce (Woods et al., 1984b).

II.3.4.1. MEMBRANAS

Cambios en la permeabilidad de la membrana en respuesta a los daños por frío han sido frecuentemente investigados, y existe evidencia de que se producen cambios en la permeabilidad de las membranas celulares cuando los frutos se conservan a temperaturas inferiores a la crítica (Lyons, 1973; Lyons et al., 1979). Muchos organismos mantienen una viscosidad óptima en las membranas al disminuir la

temperatura alterando la proporción de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos como respuesta a una adaptación homeoviscosa (Sinnensky, 1974). Esta adaptación puede jugar un papel en la regulación de sistemas enzimáticos ligados a membranas, especialmente, manteniendo una velocidad de reacción adecuada cuando las células están a diferentes temperaturas.

La composición de los lípidos de membrana puede variar bajo estrés de agua o de temperatura (Lynch y Steponkus, 1987; Parker 1959). Se ha observado que las especies resistentes son más ricas en ácidos grasos insaturados que las que son sensibles (Lyons y Asmundson 1965). Un incremento en la insaturación de los fosfolípidos relativo a mantener la fluidez de membrana es observado frecuentemente (Pomenory y Raison, 1981). Los cambios lipídicos que tienen lugar durante la aclimatación pueden tener importantes repercusiones fisiológicas (Zuñiga *et al.*, 1990). Estos hechos se observan igualmente en la conservación a bajas temperaturas entre las especies sensibles y resistentes a los daños por frío.

El transporte de agua e iones es reducido en respuesta a las bajas temperaturas. La translocación de sacarosa cesa completamente a 5°C (Hartt, 1965). Aunque es evidente que el fenómeno de translocación y el flujo de agua se reducen a bajas temperaturas, no se obtiene de esto ninguna información acerca de la permeabilidad de la membrana.

Los cambios en la permeabilidad se han medido como el flujo de solutos o acumulación de iones, encontrándose diferente comportamiento en respuesta a los daños por frío que se traduce en un incremento de la permeabilidad. Numerosos experimentos apoyan esta teoría aunque en algunos experimentos realizados con discos de tejidos se obtienen resultados contradictorios.

Los lípidos de membrana se encuentran normalmente en una fase fluida (Harwood y Russell, 1984). Al disminuir la temperatura, en las especies sensibles al frío se produce una solidificación de los lípidos de membrana, pasando a una fase gel-sólida (Quinn, 1985), hecho que tiene lugar a la temperatura crítica que en el caso de las especies tropicales y subtropicales es de 10°C -12°C.

La fase de transición no sólo incrementa la permeabilidad de la membrana, sino que también incrementa la E_a de los sistemas enzimáticos ligados a membranas, disminuyendo o suprimiendo la velocidad

de reacción y estableciendo un desequilibrio con aquellas reacciones catalizadas por sistemas enzimáticos no ligados a membranas. Por debajo de la temperatura crítica, los sistemas enzimáticos ligados a membranas presentan un incremento de la E_a , estableciéndose un mayor desequilibrio entre los dos sistemas, como consecuencia del cual se produce una acumulación de metabolitos tales como piruvato, acetaldehído y etanol, fenómeno típico de observar en los tejidos dañados por frío. Algo similar se observa en los cloroplastos donde la transición de fase conduce a una supresión de actividad y cambios en la concentración de metabolitos después de un breve periodo de enfriamiento (Taylor et al., 1972).

Las diferencias entre especies sensibles al frío, permite explicar la capacidad que algunas tienen de metabolizar estos productos tóxicos, mientras que otras no, a pesar que la primera respuesta al daño sea la misma (Watada y Morris, 1966; McGlasson y Raison 1972).

Los síntomas de los daños por frío son semejantes a los inducidos por la oxidación de radicales libres, produciéndose en ambos una acumulación de productos tóxicos, aunque tal acumulación tenga efectos diferentes.

Los daños por frío provocan un desequilibrio del metabolismo, acumulación de productos tóxicos e incremento de la permeabilidad.

Levitt (1972), propuso que todas las manifestaciones de los daños por frío son el resultado del cambio de permeabilidad y Christiansen (1969) llegó a la misma conclusión en algodón. También se ha propuesto que en el mecanismo de los daños el ATP de reserva se reduce o bien la descomposición del sistema ATP-ADP conduciría en algunos casos a un acúmulo de energía inutilizable por la célula.

Todos estos sucesos tienen en común la temperatura que induce la transición de fase en las membranas celulares como primera respuesta a los daños por frío.

II.3.4.2. CAMBIOS METABOLICOS

Los cambios metabólicos que se producen en las especies vegetales, sensibles a las bajas temperaturas son numerosos, sin embargo, el mecanismo que induce los daños por frío y de qué manera afecta al metabolismo normal es algo todavía desconocido.

Numerosos intentos se han realizado para tratar de correlacionar los cambios metabólicos ocurridos en los constituyentes celulares y la variación de las actividades enzimáticas con los daños sufridos como consecuencia de las bajas temperaturas. Sin embargo es preciso distinguir entre las primeras respuestas a los daños por frío, de aquellas que se producen como una degeneración del tejido dañado.

La mayoría de los estudios se basan en la comparación de los efectos sufridos por diferentes tejidos sometidos a un tratamiento frío y el análisis de su respuesta con respecto al comportamiento experimentado por los controles.

Los primeros trabajos que trataron de correlacionar la sensibilidad al frío con los posibles cambios metabólicos estuvieron centrados en evaluar la cantidad de azúcares no reductores y reductores presentes en los frutos sensibles y su variación con aquellas especies que se muestran resistentes a las bajas temperaturas. Disminución en la hidrólisis de sacarosa acompañada por un incremento en la concentración de sólidos solubles totales fue observado en papaya (Jones, 1942). En pomelos la concentración de sacarosa disminuye y los niveles de azúcares reductores se incrementan durante la conservación a bajas temperaturas, pero no se obtuvo diferencia en el contenido de estos azúcares en frutos procedentes de la zona más externa e interna del árbol (Purvis 1989) de lo que se deduce que la sensibilidad a los daños por frío no está directamente relacionada con la concentración de azúcares reductores.

No está claro si la acumulación de azúcares reductores es una simple consecuencia del estrés al frío o es una parte esencial del mecanismo de resistencia a las bajas temperaturas. No obstante, los azúcares juegan un papel central en el metabolismo como sustratos respiratorios y estudios realizados en diferentes tejidos vegetales muestran una correlación positiva entre la velocidad respiratoria y el contenido en azúcares (Azcon-Bieto *et al.*, 1983; Azcon-Bieto y Osmond, 1983; Saglio y Pradet, 1980).

En algunos frutos se ha observado una acelerada pérdida de ácido ascórbico, mientras que otros mantienen sus niveles.

Se ha visto que en la pulpa de banana se incrementaban los niveles de taninos después de haber sufrido un tratamiento frío y se sugirió que la oxidación de estos compuestos podría ser responsable

del oscurecimiento que mostraban los frutos dañados.

Se ha observado también (Murata y Ku, 1966) que en bananas se incrementaban los niveles de tirosina y DOPA que podrían dar lugar a pigmentos oscuros.

La acumulación de compuestos asociados con el metabolismo intermedio como acetaldehído, etanol y cetoácidos ha sido también observada.

El enfriamiento altera también el contenido en aminoácidos, estrechamiento relacionados o intermediarios de la ruta C4-fotosintética.

En pomelos se ha comprobado (Purvis, 1981) que existe una correlación entre la evolución de la prolina en la corteza de los frutos a lo largo de la temporada y su resistencia al frío, sugiriéndose que la prolina puede estar implicada directa o indirectamente en el mecanismo de las alteraciones por frío sin que se conozca cual es exactamente el papel desempeñado por este aminoácido. Plantas que sufren estrés de agua, también acumulan prolina, glicina, betaina, carbohidratos y otros compuestos (Zuñiga *et al.*, 1990). En cambio, en plántulas de cebada, el frío disminuye el contenido de prolina.

Como resultado al tratamiento frío, los tejidos sensibles incrementan la actividad invertasa, poligalacturonasa, tirosina aminoliasa, catalasa, piruvato descarboxilasa, alcohol deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Los efectos del frío también se manifiestan en la germinación y desarrollo de las semillas, en este caso, periodos muy cortos pueden producir grandes alteraciones como puede ser disminución en el contenido de RNA y proteínas (Guinn, 1971).

II.3.4.3 MITOCONDRIAS

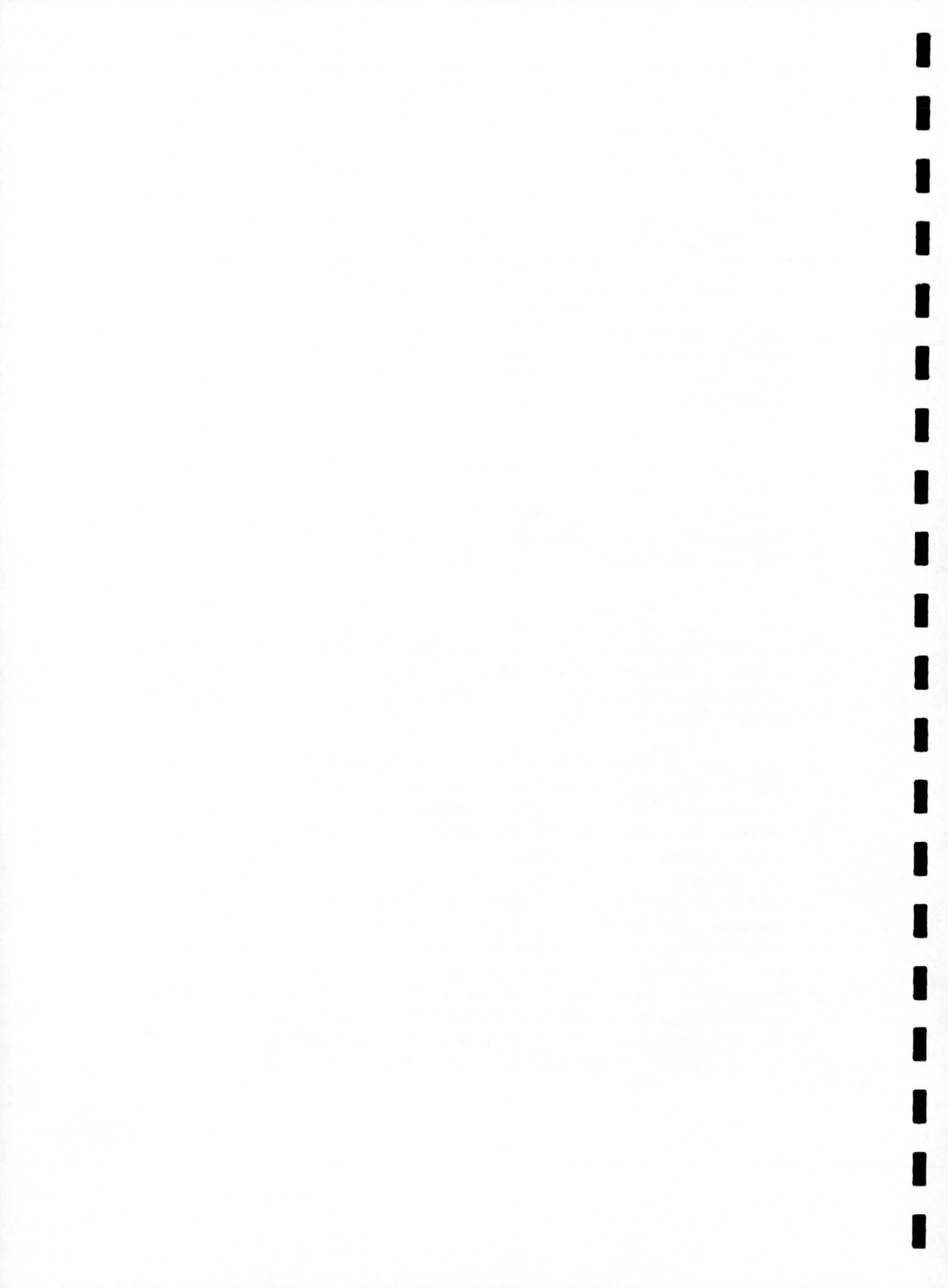
Dado el papel central que desarrollan las mitocondrias en el proceso respiratorio, se han realizado numerosos estudios para poder correlacionar los cambios fisiológicos sufridos por estos orgánulos en las especies sensibles al frío (Lieberman *et al.*, 1958).

Se han realizado diversos estudios para tratar de correlacionar los daños por frío con la respiración mitocondrial empleando para ello mitocondrias aisladas, encontrándose que en periodos cortos de enfriamiento no se producen alteraciones y sólo para largos periodos de conservación dependiendo de la especie ensayada, la actividad respiratoria declina en las mitocondrias dañadas. Minami-kawa et al (1961), también comprobaron una disminución en la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas de batatas mantenidas a 0°C frente a las conservadas a 25°C. Uritani et al, (1971) encontraron igualmente que el consumo de oxígeno y la respiración control estaban disminuidos en las mitocondrias enfriadas. La actividad malato deshidrogenasa también resultó disminuida en mitocondrias conservadas a bajas temperaturas.

Estudios ultraestructurales muestran que en los tejidos dañados por frío, las mitocondrias aparecen hinchadas y se produce una vesiculación de las crestas, fenómenos no observados en mitocondrias sanas. El hinchamiento puede ser el resultado de la degradación de los orgánulos y liberación de los fosfolípidos de la membrana interna y externa (Yamaki y Uritani, 1972a; 1972b).

Pantastico et al., (1968), aislaron mitocondrias de limas y pomelos después de un periodo de enfriamiento y encontraron que el sistema de transferencia de energía se encontraba deteriorado. Sin embargo a veces puede ser difícil distinguir entre los factores que operan durante el proceso de aislamiento de las mitocondrias y los efectos directos del frío.

Para estudiar la actividad oxidativa Lyons y Raison aislaron mitocondrias de tejidos vegetales y las sometieron a diferentes temperaturas. Si el efecto de la temperatura era presentado como un gráfico de Arrhenius, las mitocondrias de las especies resistentes mostraban un gráfico lineal con una E_a constante en un rango de temperaturas de 1°C a 25°C, mientras que las mitocondrias sensibles exhibían una discontinuidad en el gráfico de 10°C a 12°C, con un marcado incremento en la E_a seguido de una transición de fase, indicando esto que un efecto directo e inmediato de las bajas temperaturas en estas especies es la supresión de la respiración mitocondrial. Sus datos también muestran claramente que la eficiencia fosforilativa no se alteraba con la temperatura y aunque la velocidad de producción decrece al disminuir la respiración mitocondrial, la eficiencia de producción de energía no se ve alterada por las bajas temperaturas.



III. MATERIAL Y METODOS



III. MATERIAL Y METODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. FRUTOS

Todos los experimentos se han realizado con frutos de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) variedad "Fino de Jete", procedentes de la zona de Motril, Valle de Jete (Granada) y de Algarrobo-Costa (Málaga).

Las chirimoyas recién recogidas se clasificaban en base a su tamaño. Todos los experimentos y análisis se han llevado a cabo con frutos de peso comprendido entre 250 g y 300 g. Una vez seleccionados por variedad y clase se trasladaban inmediatamente al laboratorio para su posterior tratamiento.

III.1.2. EQUIPOS DE LABORATORIO

Las centrifugaciones se efectuaron en aparatos Beckman, utilizándose el modelo TJ-6 para bajas velocidades y el modelo J2-21 para velocidades mayores, ambos dotados de sistema de refrigeración. Para la centrifugación de volúmenes inferiores a 1 ml se utilizó el modelo Microfuge 11.

La cromatografía gas-líquido fue realizada en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Sigma 300, dotado con detector de ionización de llama y conectado a un integrador Perkin Elmer modelo Sigma 15. La columna instalada en el cromatógrafo ha sido una columna semicapilar de 30 m de longitud, 0,5 μ m de diámetro interno, rellena de una fase estacionaria DB-23 (50% cianopropil polixilano).

La cromatografía líquida de alta resolución se llevó a cabo en un equipo modular Waters, compuesto por dos bombas modelo 501 con mezcla de alta presión y controlador de gradientes, un detector UV-visible modelo 490, un detector de índice de refracción IR-100, inyector Reodyne con loops de inyección de 20 y 200 μ l e integración automática.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un aparato

Beckman DU-70, con compartimento termostatzado. Se utilizaron cubetas de plástico y de cuarzo de 1 y 3 ml de capacidad y de 1 cm de espesor.

Las determinaciones densitométricas de las placas de cromatografía en capa fina se realizaron con un fotodensitómetro láser, modelo LKB-ultrascan XL.

Las separaciones electroforéticas de proteínas se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida en cubetas de Bio-rad.

Para la visualización por microscopía electrónica se utilizaron un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 950 y un microscopio electrónico de transmisión Zeiss TS 100. Los cortes de las muestras se realizaron en un ultramicrotomo ULTRACUT E Reichert-Jung.

La determinación de sólidos solubles totales se llevó a cabo con un refractómetro Shibuya tipo High-contrast No. 121.

Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro Beckman Expandomatic SS-2. A este pHmetro se le acopló un electrodo de penetración Crison de 4 mm de diámetro, para realizar la determinación del pH en mesocarpio de chirimoya.

La homogeneización tisular se realizó con un aparato tipo "Potter" manual con pistilo de vidrio esmerilado en tubo de vidrio, o con un homogeneizador Sorvall Omnimixer con vaso de 50 cm³, dependiendo de la masa de tejido utilizada y de la finalidad de la extracción.

Las pesadas se realizaron en una balanza Mettler H20 T (peso máximo 160 g \pm 0'01 mg) y Cobos C-300 (peso máximo 300 \pm 0'01 g).

Las incubaciones se efectuaron en baños termostatzados P-Selecta y Precis-term (precisión \pm 1°C).

La cromatografía en capa fina se efectuó con placas de vidrio de 20x5 cm y de 25x25 cm por 3 mm de espesor, preparadas con Silicagel G60 (Merck) en el laboratorio. La separación cromatográfica se llevó a cabo en cubetas de vidrio de 56 x 56 x 19 cm con tapadera de vidrio ajustada a esmeril. El revelado de las placas se efectuó en una campana saturada de iodo.

Para la agitación de tubos y disoluciones se emplearon vibradores Heildoph Reax 2000 y agitadores magnéticos P Selecta.

Para las adiciones de pequeños volúmenes se utilizaron pipetas Gilson Pipetman. La adición de enzimas y las inyecciones en los cromatógrafos se realizó con jeringas Hamilton.

Los frutos fueron conservados durante el tiempo que duraba el tratamiento térmico en una cámara frigorífica con termostato de precisión $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

III.1.3. PRODUCTOS

En la preparación de tampones y como reactivos generales se han utilizado productos de la máxima pureza provenientes de las marcas Merck (Alemania) y Sigma Co. (EE.UU).

Los enzimas, sustratos y protectores enzimáticos DTT, EDTA, PMSF y la acrilamida procedían de las firmas Sigma Co. (EE.UU) y Boehringer-Manhein (Alemania).

Los gases N_2 , H_2 , y aire de elevado grado de pureza fueron suministrados por SEO (España).

Los patrones de los ésteres metílicos de ácidos grasos procedían de Sigma Co. (EE.UU) y Teknokroma (España).

El detergente Deccosol C. fue suministrado por la firma Pennwalt (R.U) y el fungicida Imazalil provenía de la firma Fomesa (España).

III.2. METODOS

III.2.1. TRATAMIENTO DE LOS FRUTOS

III.2.1.1. LAVADO

Los frutos, a su llegada al laboratorio, se sumergían en una disolución que contenía Decosol al 0,2% (v/v) en agua a $18-20^{\circ}\text{C}$ (el decosol es un detergente utilizado como agente mojante de los frutos). Este baño tenía como fin eliminar el polvo del fruto y esporas de hongos y mojar el epicarpio, con objeto de estar en condiciones

de recibir el siguiente tratamiento.

Una vez que los frutos habían sido mojados se trasvasaban a otra disolución que contenía el fungicida Imazalil al 0,05% (p/v) y el detergente Decosol al 0,2% en agua a 18-20°C, los frutos se mantuvieron sumergidos con agitación durante un minuto; después se escurrían y se dejaban secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente antes de ser introducidos en las cámaras, previamente termostatizadas.

III.2.1.2. TRATAMIENTO TERMICO

Los frutos, en distintos lotes, se sometieron a temperaturas de 22°C, 12°C, 4°C y 1°C respectivamente. La conservación a la temperatura de 22°C se realizó en cámaras provistas de calefactor equipado con termostato de $\pm 1^\circ\text{C}$, empleándose cámaras frigoríficas dotadas de termostato de $\pm 0'5^\circ\text{C}$ de precisión, para el resto de los tratamientos. En todos los casos se utilizaron termómetros de máximas y mínimas para comprobar que las oscilaciones de temperatura, dentro de las cámaras, quedaban dentro de los márgenes establecidos. La humedad relativa se mantuvo siempre próxima al 90%.

III.2.1.3. CONSERVACION DEL TEJIDO

Transcurrido el tiempo del tratamiento experimental y una vez estudiadas las características físicas de los frutos y algunos parámetros de maduración, como el pH y el contenido de sólidos solubles totales, que han de realizarse sobre el fruto fresco, el mesocarpio sobrante se conservó para posteriores determinaciones. Para ello, se retiraron cuidadosamente el epicarpio y endocarpio, eliminándose también las semillas. El mesocarpio limpio se cortó en trozos pequeños y se introdujo en bolsas de plástico, que tras ser cerradas y etiquetadas se conservaron a -30°C hasta el momento de utilizar el tejido.

III.2.2. DETERMINACION DE SOLIDOS SOLUBLES TOTALES (S.S.T.) Y pH

A los frutos objeto de análisis se les practicaba un corte longitudinal. En la zona ecuatorial del mesocarpio se raspó con la

punta de un cuchillo, obteniéndose una papilla (de consistencia untuosa), que se introdujo rápidamente en un tubo eppendorf. De cada fruto se tomaron tres muestras, provenientes de cortes no contiguos. Se operaba con la mayor rapidez posible ya que la desecación del tejido eleva notoriamente el valor de S.S.T., por lo que fue preciso operar siempre en un corte fresco.

Una vez cerrados, los tubos eppendorf se centrifugaban a 10.000 xg durante 5 min y se dejaban reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación presenta una consistencia semejante a un jarabe, más o menos espeso, dependiendo del estadio de maduración del fruto.

Las medidas se llevaron a cabo con un refractómetro, que se calibró con agua destilada a temperatura ambiente. A continuación con cuidado de que no cayera nada del sedimento, lo cual enturbiaría el líquido y falsearía la lectura, se vertieron unas gotas sobre el prisma del refractómetro leyéndose el índice de refracción expresado en grados Brix. La conversión de la lectura desde la temperatura del laboratorio hasta 20°C se extrapoló entre valores tabulados.

En el sedimento que quedaba en el tubo eppendorf (aproximadamente 0,8 ml), se introducía un electrodo de pH procurando no ejercer ninguna presión lateral y se efectuaba la lectura del pH en un pHmetro.

III.2.3. PREPARACION DE EXTRACTOS

Se han realizado tres tipos diferentes de extracciones del mesocarpio de los frutos:

- Extractos metanólicos utilizados para la determinación de azúcares.
- Extractos acuosos para la determinación de actividades enzimáticas.
- Extractos lipídicos para la separación de lípidos totales, fosfolípidos, determinación de fósforo lipídico y de ácidos grasos.

III.2.3.1. EXTRACTOS METANOLICOS

Para la preparación de los extractos metanólicos se tomó una sección longitudinal del fruto desprovista de epicarpio, se partió en trozos pequeños y se pesaron 5 g. Las homogeneizaciones se realizaban con un aparato "Sorval Omnimixer", utilizándose un vaso de 50 ml, en el que se introducía el tejido previamente troceado y 10 ml de metanol al 80%. La operación se realizaba conectando el homogeneizador a velocidad máxima durante 5 minutos, manteniendo el vaso sumergido en baño de agua a 20°C durante todo el tiempo.

El homogeneizado resultante se pasaba a un tubo de centrífuga al que se añadían 13 ml de metanol al 80%, dejándose a temperatura ambiente un mínimo de 30 min, agitando ocasionalmente, para favorecer la completa extracción del tejido. Posteriormente se centrifugaba a 10.000 xg durante 10 min a 20°C. El sobrenadante se trasvasaba a un matraz aforado de 50 ml. El sedimento se reextraía resuspendiéndolo, con ayuda de una varilla de vidrio, en 22 ml de metanol al 80%. Los tubos cerrados se dejaban a temperatura ambiente un mínimo de 30 min, y pasado este tiempo se centrifugaban en las condiciones anteriores.

El sobrenadante obtenido en la segunda centrifugación se añadía al matraz que contenía el proveniente de la primera y finalmente se enrasaba a 50 ml. El extracto así preparado se vertía en un bote de plástico, que una vez cerrado herméticamente se conservó a -30°C hasta el momento de ser utilizado.

III.2.3.2. EXTRACTOS ACUOSOS

Para la preparación del extracto se tomaba un trozo de mesocarpio que se troceaba finamente con un cuchillo para favorecer su posterior trituración. Las extracciones se realizaron en un homogeneizador "Sorval Omnimixer" con un vaso de 50 ml de capacidad al que se añadían 10 ml del medio de extracción compuesto por tampón fosfato 0'1 M, pH 6'7, Tritón X-100 al 0'1% (v/v), PMSF 1 mM, DTT 1 mM y PVPP al 25% (p/p) por cada gramo de tejido. La operación se realizaba con el aparato conectado a velocidad máxima durante 1 o 2 minutos, manteniendo este tiempo el vaso sumergido en baño de hielo.

El extracto se centrifugaba a 31000 xg y 4°C durante 15 min. A continuación el sobrenadante se trasvasaba a un tubo de cristal y se

mantenía en baño de hielo, para llevar a cabo en él las determinaciones enzimáticas, que fueron realizadas en un tiempo no superior a las 5 horas tras la obtención del extracto.

III.2.3.3. EXTRACTOS LIPIDICOS

La extracción de lípidos se ha realizado siguiendo básicamente el método descrito por Folch (1957), en el que se han introducido algunas modificaciones.

Un gramo de tejido previamente picado se introducía en un homogeneizador tipo "Potter" manual, junto con 12 ml de la mezcla cloroformo:metanol:ácido clorhídrico (200:100:1 en volumen) y BHT al 0'005%. El tiempo de homogeneización fue variable dependiendo de la dureza del mesocarpio, oscilando entre 3 y 12 minutos.

El homogeneizado resultante se vertía a un tubo de boca esmerilada al que se añadían 5 ml de ácido clorhídrico 0'1 N, y se agitaba enérgicamente durante 1 minuto, manteniéndose en baño de hielo hasta el momento de ser centrifugado.

Las centrifugaciones se realizaron a 2800 xg y 4°C durante 10 min. La mezcla se separaba en tres fases, la superior, de naturaleza hidroalcohólica, se eliminaba con ayuda de una pipeta pasteur. La inferior o clorofórmica se trasvasaba a otro tubo mediante una cuidadosa decantación. Con la fase intermedia de naturaleza protéica se practicaba una segunda extracción, añadiendo 4 ml de la mezcla cloroformo:metanol:ácido clorhídrico y BHT y 2'5 ml de ácido clorhídrico 0'1 N. Esta segunda extracción al igual que la primera, se facilitaba por la agitación de la mezcla durante 1 min en dos intervalos de 30 segundos. Seguidamente se sometía a una centrifugación análoga a la descrita anteriormente, recogiendo de nuevo la fase clorofórmica.

Una vez reunidas las dos fases clorofórmicas se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 30°C. El extracto lipídico así obtenido se mantuvo a -30°C en un tubo herméticamente cerrado y en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de ser utilizado, este periodo no fue en ningún caso superior a las dos horas.

III.2.4. DETERMINACION DE AZUCARES

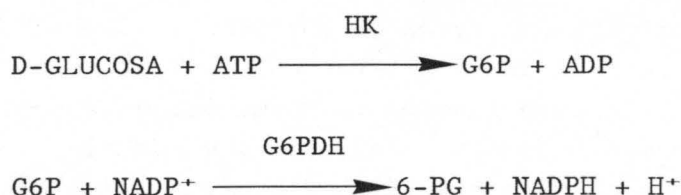
De los extractos metanólicos, preparados como se ha descrito en el apartado III.2.3.1, se tomaron alícuotas de 1 ml que se evaporaron en una campana de desecación conectada a vacío, hasta un volumen aproximado de 100 μ l, reemplazándose el volumen evaporado por agua destilada. A continuación se centrifugaron a 10.000 xg durante 3 min. En estas condiciones se procedió a la determinación del contenido en azúcares por distintas técnicas.

III.2.4.1. METODOS ENZIMATICOS Y QUIMICOS

III.2.4.1.1. DETERMINACION DE GLUCOSA

La glucosa se ha determinado enzimáticamente por dos métodos distintos, utilizando hexoquinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o glucosa oxidasa y peroxidasa.

Para el primer método se ha utilizado la técnica descrita por Bergmeyer et al., (1974) que se basa en la medida espectrofotométrica a 340nm de la aparición de NADPH. La reducción del NADP⁺ se produce al oxidarse la G6P en presencia de G6PDH



El equilibrio de ambas reacciones está desplazado hacia la derecha por lo que la producción molar de NADPH es idéntica a la cantidad de glucosa existente en la cubeta de reacción. El medio se componía de tampón Trietanolamina 0'25 M, pH 7'5, MgSO₄ 2'5 mM, ATP 10 mM, NADP⁺ 0'8 mM y una unidad por ml de cada uno de los enzimas G6PDH y HK. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml a 25°C.

Dado que este método permite evaluar también la G6P presente en el medio, y comprobado que en nuestras muestras no se detectaban valores apreciables de G6P, operamos de la siguiente forma: una vez adicionada la muestra, se realizaba la primera lectura de absorbancia (D.O.₁), a continuación se añadían 1 U de HK y 1 U de G6PDH, y

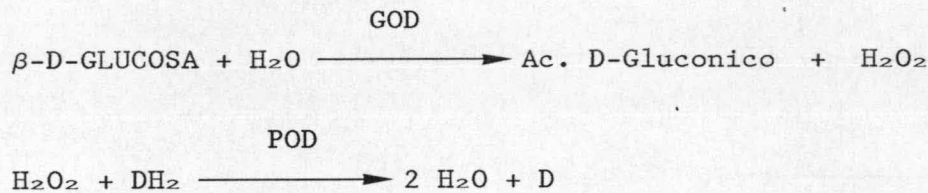
cuando se obtenía un valor estable de absorbancia se leía la D.O.₂.

LA D.O.₂ - D.O.₁ representa el incremento debido a la glucosa consumida. La concentración de glucosa en mesocarpio se expresa en mg de glucosa x g⁻¹ de tejido. La conversión de los valores de D.O. en estas unidades se realizó mediante la siguiente transformación:

$$D.O. \times \epsilon^{-1} \times Vm^{-1} \times Fd \times A \times 10^{-3} \times 180$$

Siendo $\epsilon = 6,22 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$, Vm = volumen de muestra, Fd = factor de dilución, A = concentración del extracto metanólico en ml x g⁻¹ de tejido, 180 es el peso molecular de la glucosa.

El método de la GOD-POD empleado fue el descrito por Bergmeyer y Bernt (1974), empleándose O-dianisidina como cromógeno. Está basado en la oxidación de la glucosa por acción de la GOD, el H₂O₂ producto de esta reacción, en presencia de POD y de un donador de H (O-dianisidina), se reduce al tiempo que el donador se oxida. La O-dianisidina oxidada, presenta un máximo de absorbancia a 440 nm.



La GOD es un enzima específico de la β -D-glucosa, pero debido a que las preparaciones comerciales de este enzima, suelen ir acompañadas de pequeñas cantidades de mutarrotasa, es posible determinar toda la glucosa presente en la muestra.

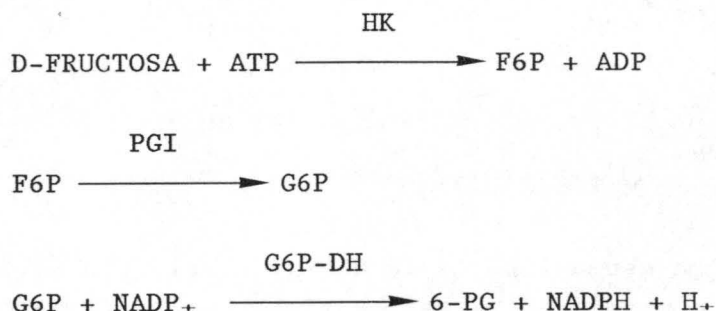
La técnica se basa en la realización de una curva patrón con diferentes tubos conteniendo concentraciones de glucosa conocidas, con la que se comparaban los valores de D.O. obtenidos con las muestras convenientemente diluidas. El rango de concentración empleado para los patrones estaba comprendido entre 0,05-0,2 mM. A un volumen de 1ml de muestra o patrón de glucosa, se añadían 2,5 ml de mezcla enzimática y, tras ser agitados los tubos, se realizaba una incubación a 37°C durante 30 min. Finalizada la incubación se midió la D.O. a 440 nm. La mezcla enzimática se preparaba disolviendo 9,3 mg de GOD, 3 mg de POD y 0,5 ml de una suspensión de O-dianisidina, preparada en etanol de 95° al 1%, en un volumen final de 75 ml de tampón fosfato-tris 0,2 M-0,1 M, pH 7,3.

En el rango de concentración empleado la respuesta es lineal, siendo proporcional la D.O. medida a la concentración de glucosa. Mediante una regresión lineal los resultados estándar se ajustan a una recta en la que por extrapolación se calculan las concentraciones de glucosa presente en las muestras. Los resultados se expresan como mg de glucosa x g⁻¹ de tejido, teniendo en cuenta previamente el factor de dilución empleado.

III.2.4.1.2. DETERMINACION DE FRUCTOSA

La fructosa se ha determinado enzimáticamente por el método descrito por Bernt (1974) con algunas modificaciones, o químicamente por el método de Roe y Papadopoulos (1954).

El método de Bernt está basado en la medida espectrofotométrica a 340 nm del NADPH producido cuando se acoplan las reacciones catalizadas por la hexoquinasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.



Básicamente el método es idéntico al descrito para la determinación de glucosa, con la salvedad de que hay que oxidar toda la glucosa 6-fosfato fosforilada por la hexoquinasa o presente en el extracto, antes de adicionar la fosfoglucoisomerasa.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml. Una vez que se había adicionado la HK (1 U.), se realizaba la primera lectura de absorbancia D.O.₁, a continuación se añadía 1 U de G6PDH y cuando la reacción había finalizado por completo (aproximadamente 10 min), se medía de nuevo la D.O. (D.O.₂), finalmente se adicionaban 2'4 U. de PGI. La D.O.₃ se leía una vez transformada toda la F6P presente en el medio.

Por diferencia de los valores de absorbancia medidos, determinamos la cantidad de glucosa y fructosa presentes en la muestra:

$$(D.O.2 - D.O.1)_{muestra} - (D.O.2 - D.O.1)_{blanco} = D.O. glucosa + G6P$$

$$(D.O.3 - D.O.2)_{muestra} - (D.O.3 - D.O.2)_{blanco} = D.O. fructosa + F6P$$

En nuestras muestras no se detectaron valores apreciables de G6P ni de F6P, evaluándose la concentración de glucosa y fructosa presentes mediante el siguiente cálculo:

$$C(\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}) = D.O. \times Vc \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times Vm^{-1}.$$

Donde: $\epsilon = 6'22 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$, Vc = volumen de reacción, d = 1 cm (anchura de la cubeta o paso de luz), Vm = volumen de muestra en el medio de ensayo en ml.

La concentración de estos azúcares en mesocarpio de chirimoya está expresada en mg x g⁻¹ de tejido. La conversión de los valores de D.O. en estas unidades se realizó mediante la siguiente transformación:

$$D.O. \times \epsilon^{-1} \times Vm^{-1} \times 180 \times 10^{-3} \times Fd \times A$$

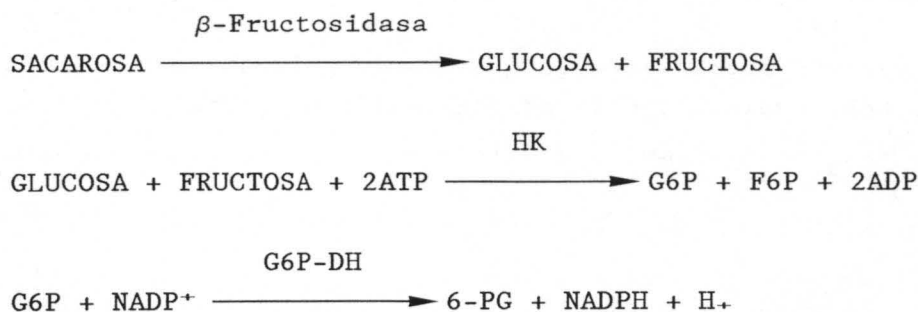
Siendo: Fd = factor de dilución del extracto, A = concentración del extracto metanólico en ml x g⁻¹ de tejido., 180 representa el peso de 1 mol de azúcar (glucosa o fructosa).

El método de Roe y Papadopoulos (1954) se fundamenta en la reacción que tiene lugar entre la fructosa y el resorcinol en medio ácido que da lugar a un compuesto coloreado (liláceo-rosado), cuya D.O. medida a 515 nm es proporcional a la cantidad de fructosa presente en la muestra. Este método se ha usado para la determinación de sacarosa, que indirectamente nos servía para la determinación de fructosa, por lo que se explicará en otro apartado.

III.2.4.1.3 DETERMINACION DE SACAROSA

Se ha seguido básicamente el método enzimático descrito por Bergmeyer y Bernt (1974) con algunas modificaciones, o un método químico.

- El método enzimático está basado en que la β -fructosidasa o invertasa (β -D-fructofuranosido fructohidrolasa, EC 3.2.1.26) cataliza la hidrólisis de sacarosa produciendo glucosa y fructosa. En el hidrolizado se lleva a cabo la determinación de glucosa acoplado las reacciones de la hexoquinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.



Se realizó una incubación a 25°C durante 15 minutos, tomando 0'2 ml de muestra, 0'1 ml de tampón acetato 0'1 M, pH 4'6 y 0'025 ml de una solución de invertasa (37'5 U/ml en tampón citrato 0'1 M, pH 4'6. En el hidrolizado se determinó la concentración de glucosa.

Los valores de concentración de glucosa obtenidos corresponden al total de glucosa presente en la muestra, tanto a la glucosa libre como a la procedente de la hidrólisis de la sacarosa. La diferencia entre el valor de concentración después de la inversión y la concentración de glucosa libre representa la concentración de sacarosa.

Según la estequiometría de la reacción, por cada mol de sacarosa hidrolizado se obtiene un mol de glucosa. Para expresar la concentración de sacarosa como mg de sacarosa $\times g^{-1}$ de tejido, los valores obtenidos en la determinación de glucosa como μ moles de glucosa $\times g^{-1}$ de tejido se multiplican por el peso molecular de la sacarosa.

- El método químico se llevó a cabo por combinación de los métodos descritos por Roe y Papadopoulos (1954) para la determinación de F6P y de Cardini *et al.*, (1955) para la determinación de sacarosa, en los que se ha introducido alguna modificación.

El método de Cardini se basa en la destrucción de la fructosa libre presente en el medio, por tratamiento con NaOH a 100°C. Eliminada la fructosa libre podemos evaluar la fructosa procedente de la hidrólisis de la sacarosa por el método de Roe y Papadopoulos.

El ensayo se basa en la preparación de patrones de concentración de fructosa conocida, junto con las muestras problema. Las medidas estándar se realizaron en un rango de concentración de fructosa de 25 μM a 1 mM, partiendo de una solución de fructosa 20 mM.

Un lote de muestras se incubaba con NaOH 5 N en un baño a 100°C durante 10 min para destruir la fructosa libre y una vez enfriadas se sometían al mismo tratamiento que las muestras originales.

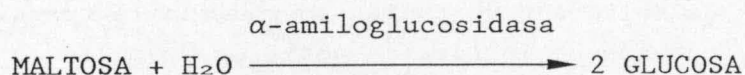
A un volumen de 0'5 ml de los patrones, de las muestras sin tratar y de las muestras tratadas en medio básico, convenientemente diluídas, se añadían 0'5 ml del reactivo de Roe y Papadopoulos (solución preparada con 0'1 g de Resorcinol y 0'25 g de Tiourea en 100 ml de ácido Acético glacial) y 1'5 ml de HCl concentrado, incubándose en un baño a 80°C durante 13 minutos. El HCl hidroliza la sacarosa, por lo que la medida de fructosa obtenida representa el total de este azúcar presente en el medio. Una vez que las muestras se habían enfriado se midió su D.O. a 515 nm.

La recta estándar se obtuvo mediante ajuste de los valores experimentales por regresión lineal. La concentración de fructosa presente en las muestras se calculó por extrapolación en la recta patrón de los valores experimentales obtenidos. La diferencia entre la concentración de fructosa total y la concentración de fructosa procedente de la hidrólisis de la sacarosa representa la concentración de fructosa libre. Los resultados se expresan como mg de fructosa $\times g^{-1}$ de tejido y mg de sacarosa $\times g^{-1}$ de sacarosa respectivamente, teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado, la concentración del extracto de partida y el peso molecular del azúcar respectivo.

III.2.4.1.4 DETERMINACION DE MALTOSA

La determinación de maltosa se realizó siguiendo básicamente el método descrito por Gutmann (1974), con algunas modificaciones.

El método se basa en la reacción de hidrólisis catalizada por la α -glucosidasa, mediante la cual la maltosa se hidroliza a dos moléculas de glucosa.



La glucosa formada puede ser determinada por fosforilación con ATP en presencia de HK, seguida de su oxidación a 6-PG mediante la acción de la G6PDH. El NADPH formado es proporcional a la cantidad de glucosa procedente de la maltosa (por cada mol de maltosa hidrolizada se producen dos moles de glucosa que conducen a la aparición de dos moles de NADPH).

La concentración de glucosa determinada no responde únicamente a la procedente de la maltosa sino también a la posible glucosa libre y a la glucosa procedente de la hidrólisis de la sacarosa, ya que la α -amiloglucosidasa no es específica de la maltosa y es capaz de hidrolizar también la sacarosa. Por este motivo es necesario hacer un ensayo paralelo para determinar la glucosa libre y la glucosa proveniente de la sacarosa.

Para proceder a la hidrólisis de la maltosa se realizaba una incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, tomando 0,5 ml de tampón acetato 50 mM pH 6'6, un volumen conveniente de muestra y 12 U de α -amiloglucosidasa. En el hidrolizado se encuentra la glucosa procedente de la hidrólisis de la maltosa, la glucosa libre existente en la muestra y parte de glucosa procedente de la hidrólisis de la sacarosa si bien en estas condiciones la sacarosa no se ha hidrolizado totalmente.

Es preciso proceder a una hidrólisis completa de la sacarosa para poder después determinar exactamente la glucosa procedente de la maltosa. Para ello se realiza una segunda incubación con un volumen conveniente del hidrolizado anterior añadiendo β -Fructosidasa y modificando el pH del medio a 4'6 (pH óptimo para la actuación de este enzima), para conseguir la hidrólisis completa de la sacarosa.

Seguidamente se procede a la determinación de glucosa como se ha descrito en el apartado III.2.4.2.1.

El valor de glucosa obtenido representa el total valorado. Para obtener la concentración de glucosa procedente exclusivamente de la maltosa, hay que restar la glucosa libre y la procedente de la hidrólisis de la sacarosa.

Según la estequiometría de la reacción de hidrólisis, por cada mol de maltosa se obtienen 2 moles de glucosa. Para expresar la concentración como mg de maltosa/g de tejido se realiza la transformación molar y a continuación se multiplica por el peso molecular de

la maltosa.

III.2.4.1.5 DETERMINACION DE ALMIDON.

Para la determinación de almidón, se pesaba un gramo de mesocarpio, que era homogeneizado en 5 ml de metanol:cloroformo:agua (12:5:3) en volumen, con un aparato tipo "Potter" de 10 ml de capacidad agitando ininterrumpidamente con un agitador mecánico.

El homogeneizado del tejido se centrifugaba a 1.100 xg durante 10 min y el sedimento obtenido se sometía a cuatro lavados sucesivos con las centrifugaciones correspondientes, en las condiciones arriba indicadas, con objeto de eliminar los azúcares reductores y fenoles solubles libres (Dekker y Richard, 1971).

Los tubos que contenían el sedimento, se introdujeron en un baño a 50°C durante toda la noche para eliminar el cloroformo presente en las muestras. Una vez enfriados hasta alcanzar la temperatura ambiente se añadían 2 ml de etanol:agua al 50% y tras agitar unos instantes se añadían 4 ml de agua destilada, se agitaban de nuevo y se llevaban a un baño a 100°C durante 30 min, periodo necesario para una óptima gelatinización.

Conseguida la gelatinización del almidón, y enfriados los tubos, se procedía a su hidrólisis. Para ello se añadían 1,8 U. de Amiloglucosidasa (E.C.3.2.1.3. α -1,4 glucan hidrolasa). A continuación, previa agitación de los tubos, se introdujeron en un baño a 50°C durante 96 horas, tiempo descrito para la máxima hidrólisis del almidón (Haissig y Dickson, 1979). Durante este tiempo se evitó la agitación ya que ésta dificulta la hidrólisis del almidón, (Greub y Wedin, 1969).

Finalizada la incubación y una vez que los tubos habían alcanzado la temperatura ambiente se añadía agua destilada hasta un volumen final de 5 ml, y a continuación se centrifugaban a 2.800 xg durante 10 min. De los sobrenadantes se tomaron alícuotas de 1,5 ml, que se introducían en tubos eppendorf y se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

El contenido de almidón presente en las muestras se determinó midiendo la concentración de glucosa obtenida en la hidrólisis anteriormente descrita, siguiendo para ello una determinación enzimática

basada en el empleo de glucosa oxidasa, peroxidasa y usando como cromógeno ortodiansidina, Bergmeyer y Bernt (1974). Los resultados se expresaron como mg de almidón/g de tejido.

III.2.4.2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA

La separación se llevó a cabo con una columna U-Spherogel Carbohydrate (Beckman) de 30 cm de longitud, 7'5 mm de diámetro interno y 10 μ m de diámetro de partícula, termostatzada a 90°C.

Se operó en modo isocrático a un flujo de 0'6 ml/min y a 90°C, empleándose como fase móvil agua desionizada, filtrada a través de membranas de nylon de 0'45 μ m de poro. La detección se realizaba en un detector diferencial de índice de refracción con una célula control y una célula de medida con capacidad de 10 μ l.

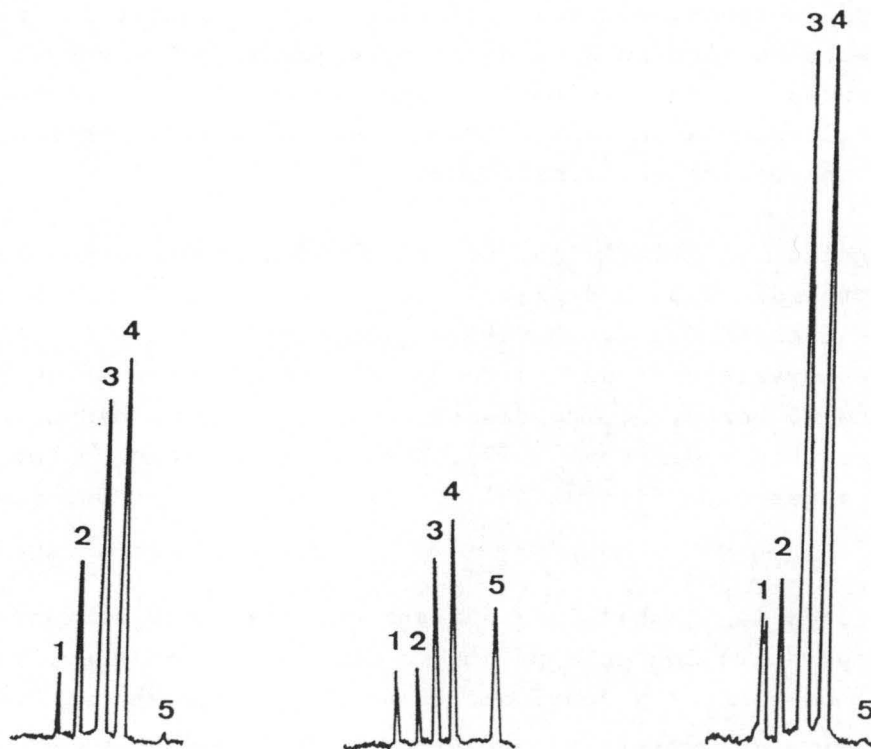


Figura 1.- Separación por cromatografía líquida de alta presión de azúcares extraídos de mesocarpio de chirimoyas en diferentes estadios de maduración. Los picos indicados corresponden a: 1) Azúcares aminados, 2) Sacarosa, 3) Glucosa, 4) Fructosa y 5) Derivado de Inositol.

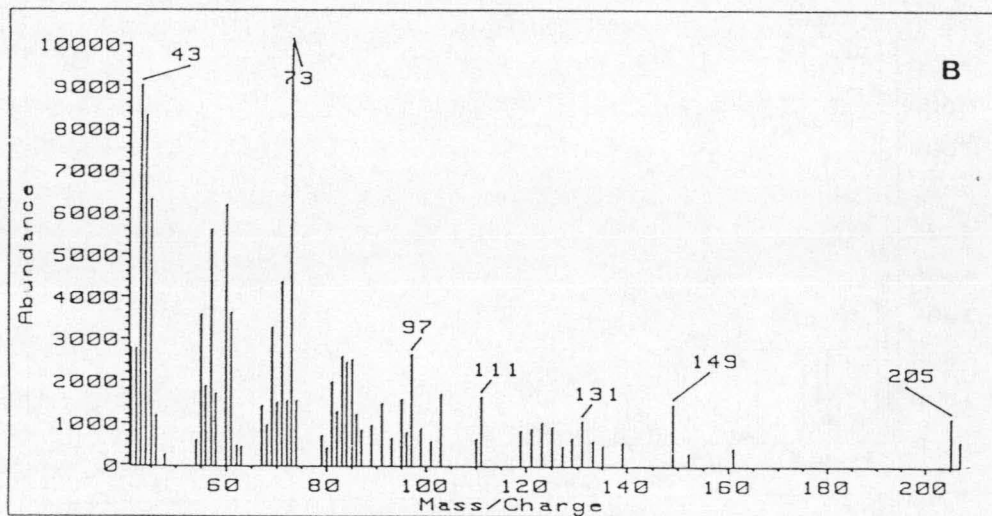
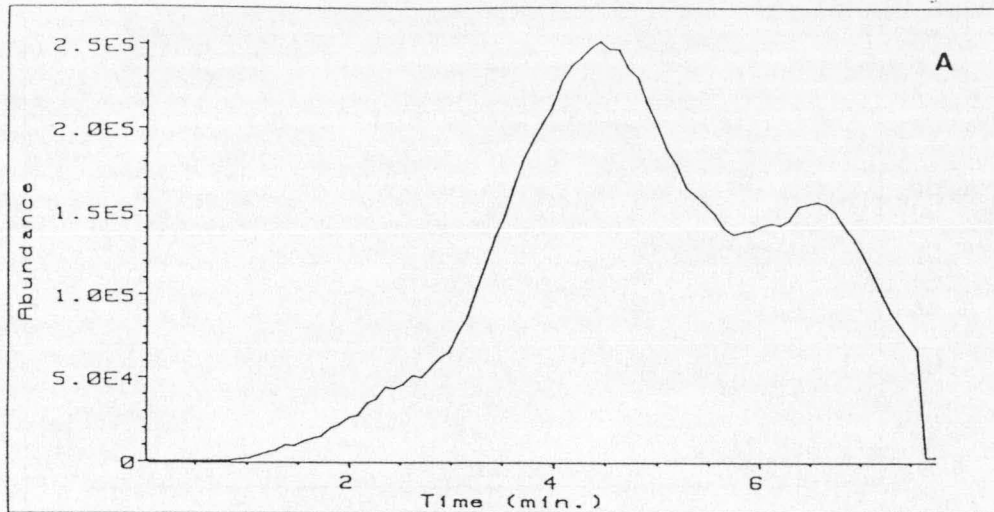


Figura 2.- Espectrometría de masas del azúcar correspondiente al pico 1, cuando éste se recoge como un pico cromatográfico puro, tras la separación por HPLC (ver Figura 1). A) Cromatograma de iones totales. B) Espectro de masas correspondiente al cromatograma de iones totales.

Se realizó en primer lugar una determinación cualitativa, por comparación de los tiempos de retención de soluciones conocidas y de las muestras. Cromatogramas típicos se muestran en la Figura 1, donde pueden apreciarse únicamente 5 picos, sea cual sea el estadio de maduración de los frutos. De ellos han sido claramente identificados por medio de patrones los picos 2, 3 y 4 que corresponden a sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente.

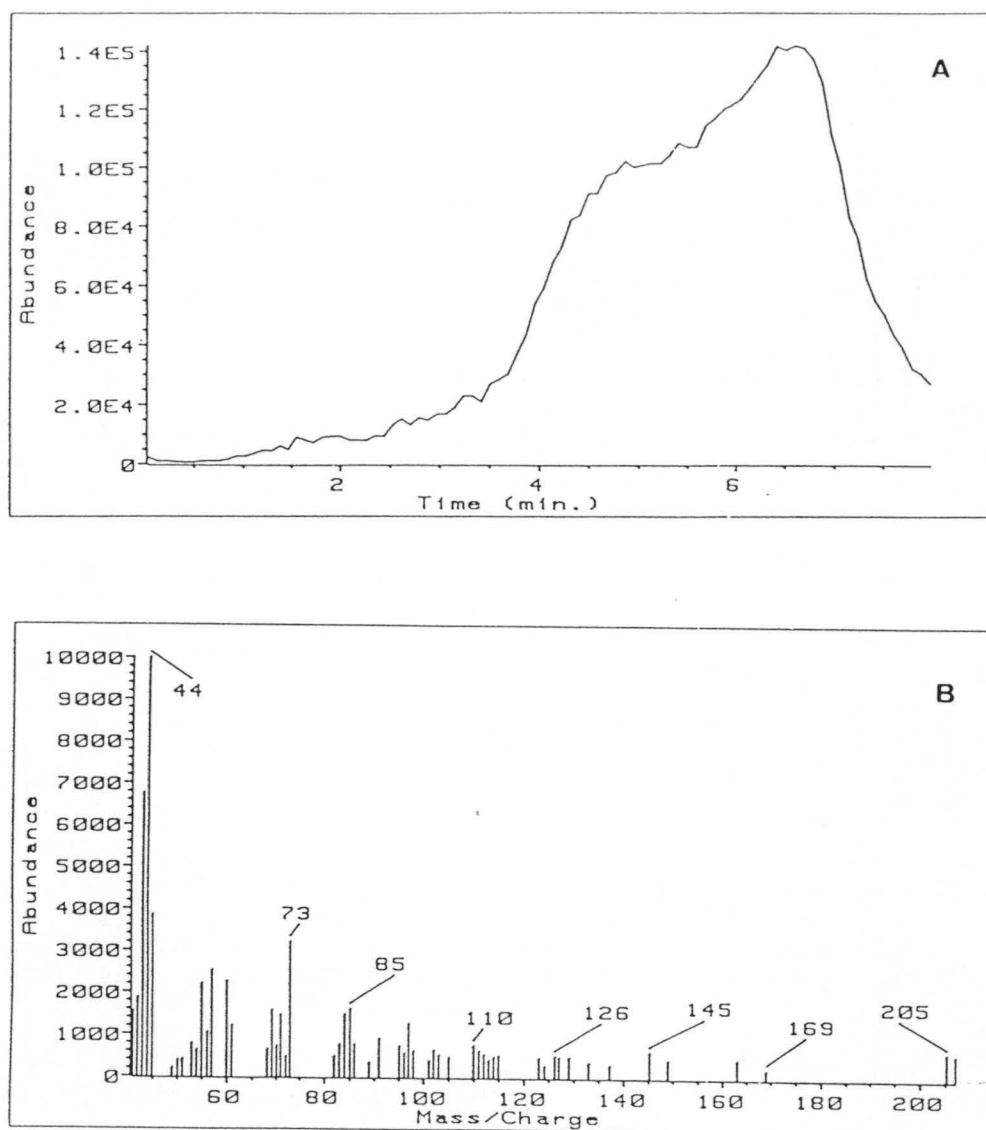


Figura 3.- Espectrometría de masas del azúcar correspondiente al pico 1, cuando éste aparece como un pico cromatográfico desdoblado, tras la separación por HPLC (ver Figura 1). A) Cromatograma de iones totales de la segunda fracción del pico 1. B) Espectro de masas correspondiente al cromatograma de iones totales. (Cuando se analiza la primera fracción del pico se obtiene el mismo resultado).

Para la determinación cuantitativa se prepararon curvas de calibrado de los azúcares identificados, calculándose la respuesta específica del detector para cada azúcar. Los valores de área obtenidos en el cromatograma de las muestras problema fueron extrapolados a cada una de las rectas de regresión calculadas para cada azúcar. Las concentraciones se expresaron como mg de azúcar por g

de tejido.

Los picos aparecidos en el cromátograma que no pudieron ser identificados con los patrones empleados, se trataron de identificar por espectrometría de masas. Para ello se recogió un volumen conveniente del eluato del pico a identificar y tras ser concentrado en una campana de desecación conectada a vacío, se liofilizó. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas.

El pico 1, como puede apreciarse en la Figura 1, aparece desdoblado en algunos estadios de la maduración. En cualquier caso, cuando se recogía como una única fracción o por separado en dos fracciones siempre presentaba el mismo espectro de masas (Figuras 2 y 3), aunque éste no ha permitido la identificación inequívoca del compuesto. Su peso molecular de 205 y la comparación con espectros de azúcares aminados, hace pensar que se trate de un derivado glucídico de este tipo.

El pico 5 fue identificado positivamente como un derivado del Inositol (Figura 4). Sin embargo, este pico no es mio-inositol, ya que cuando éste se inyectaba en el cromatógrafo líquido presentaba un tiempo de retención ligeramente inferior y los espectros de masas respectivos tampoco se corresponden exactamente.

III.2.5. DETERMINACION DE PROTEINAS

La medida de la concentración de proteínas se realizó siguiendo el método descrito por Bradford (1976).

La técnica se basa en que el Coomassie Brilliant Blue G-250 existe en dos formas con diferente color, una roja que vira a azul al constituirse el complejo proteína-colorante. Este complejo presenta un máximo de absorción a 595 nm y un coeficiente de extinción molar alto, lo que le proporciona gran sensibilidad al método.

El reactivo azul Coomassie, se preparó disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95 %. A esta disolución se añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85 % (p/v) y se diluye con agua destilada hasta un volumen de 1 l. Seguidamente se filtra y puede conservarse a 20°C durante aproximadamente dos semanas.

El método se basa en la preparación de unas medidas estándar de concentración de proteína conocida junto con las muestras convenientemente diluidas. El volumen final en cada tubo debe ser de 0'1 ml. La curva patrón utilizada contenía una concentración de proteína de 50 a 500 μg de proteína/ml.

A los tubos ya preparados se les añadieron 5 ml del reactivo azul Coomassie y tras ser agitados se midió la D.O. a 595 nm, transcurridos 5 min.

La concentración de proteína y la D.O. medida no muestran una relación lineal, por lo que los resultados estándar se ajustaron a una curva mediante una regresión no lineal. La concentración de proteína en las muestras se obtiene por extrapolación de los valores de D.O. en la curva patrón, teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado.

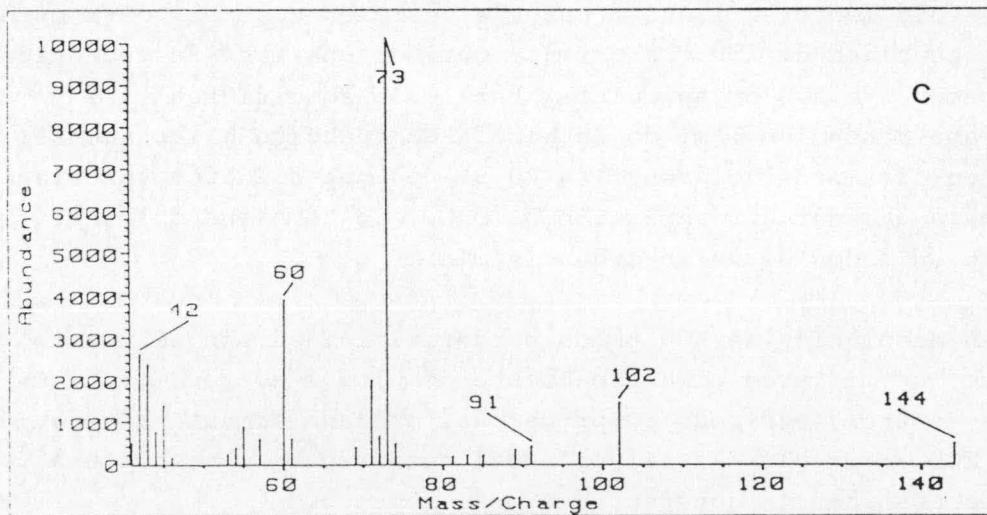
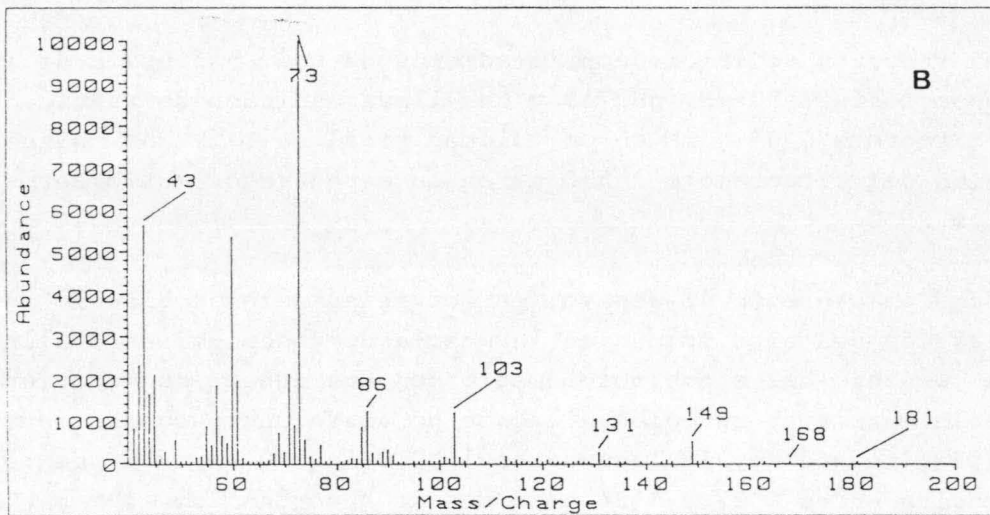
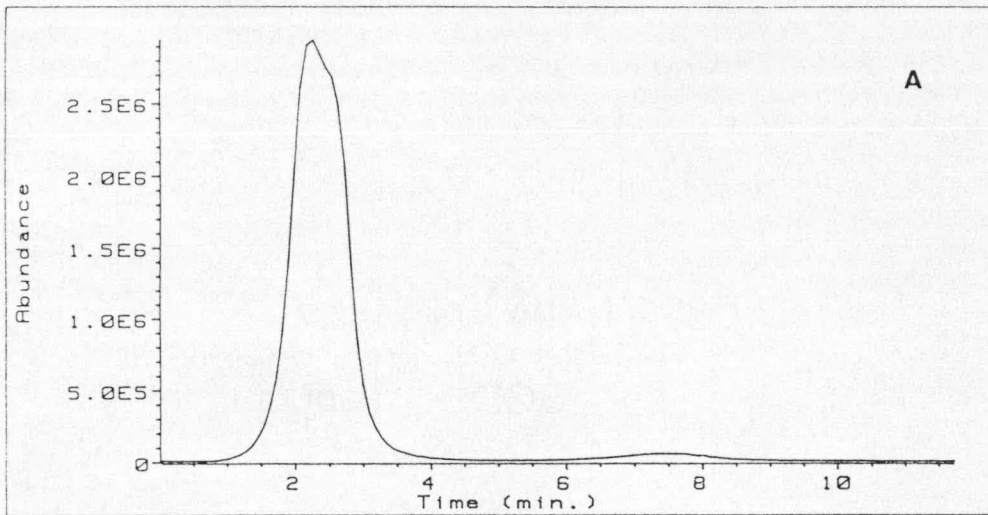
III.2.6. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

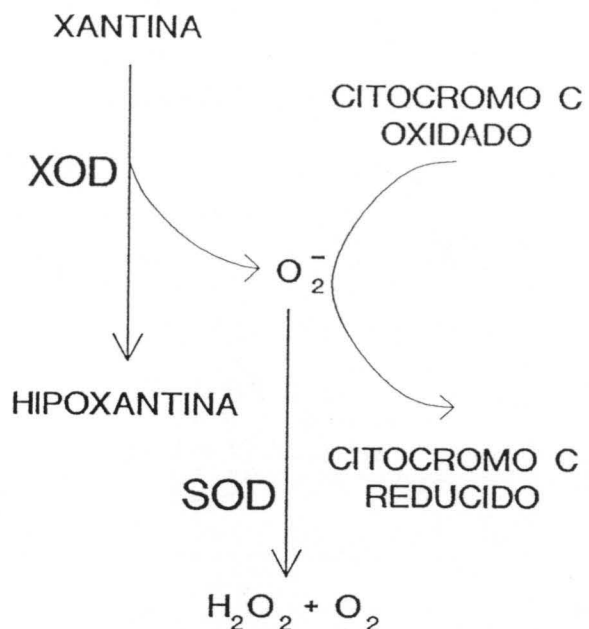
III.2.6.1. SUPEROXIDO DISMUTASA

Para la determinación de actividad SOD se ha seguido esencialmente el método descrito por McCord y Fridovich (1969) a excepción de las concentraciones de citocromo c y de xantina empleadas en la mezcla de reacción.

El método se basa en la medida de la tasa de inhibición, por la SOD, de la reducción del citocromo c por los radicales O_2^- que son generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa.

Figura 4.- Espectrometría de masas del azúcar correspondiente al pico 5, tras la separación por HPLC (ver Figura 1). A) Cromatograma de iones totales del pico 5. B) Espectro de masas correspondiente al cromatograma de iones totales. C) Espectro de masas del mioinositol.





La reacción se inicia con la adición de una suspensión de XOD a un tampón fosfato 50 mM, pH 7'8 y que lleva adicionado xantina 0'83 mM y citocromo C 0'14 mM en un volumen final de 1 ml. Se sigue la reducción del citocromo c a 550 nm en un espectrofotómetro termosta-tizado a 25°C.

Como paso previo al ensayo, es conveniente comprobar el estado de oxidación del citocromo c en la mezcla de reacción. Para ello se ajusta el cero del espectrofotómetro con una cubeta que contiene 1 ml de la mezcla de reacción a la que se añade una pequeña cantidad de ditionito sódico, la lectura de la D.O. a 590 nm debe de estar comprendida entre 0'22 y 0'24 unidades de absorbancia.

Seguidamente se llevó a cabo la reacción control, para establecer la cantidad de XOD que permite obtener una tasa de reducción del citocromo C a 550 nm apropiada. Para ello se midieron varias cubetas, que contenían 1 ml de la mezcla de reacción a las que se adicionaron distintos volúmenes (4-20 μ l) de una dilución apropiada de XOD hasta obtener una variación de D.O./min comprendida entre 0'024 y 0'026 unidades de de absorbancia/min.

La disolución de XOD puede perder actividad con el tiempo, por lo que se midieron simultáneamente con las muestras problema una cubeta control, pudiendo comprobar así en cada momento la actividad de la XOD y corregir la dilución del enzima para mantener una variación de absorbancia constante en todo momento.

El volumen de solución enzimática empleado se obtuvo por medio de diferentes ensayos con distintos volúmenes de extracto crudo en el medio de reacción.

Con objeto de evitar posibles interferencias en la reducción del citocromo c por algunos componentes de la mezcla problema (en nuestro caso se utilizaron extractos crudos), se añadió KCN a la mezcla de reacción, tanto en la cubeta control como en la problema hasta una concentración final de $10\mu\text{M}$.

El cálculo de la actividad enzimática se efectuó mediante la determinación del % de inhibición producido por la muestra según la expresión:

$$\% \text{ INHIBICION} = \frac{\text{D.O./min (control)} - \text{D.O./min (muestra)}}{\text{D.O./min (control)}} \times 100$$

Los porcentajes de inhibición deben ajustarse a un 50% como máximo ya que este valor representa el límite de linealidad entre la concentración del enzima y el % de inhibición producido. Una vez conocida la tasa de inhibición y teniendo en cuenta el volumen de solución enzimática empleada, se expresa la actividad en unidades de SOD por ml según definieron McCord y Fridovich (1969):

$$\text{Unidades de SOD/ml} = \frac{\% \text{ INHIBICION}}{50 \% \times V} \times d$$

Siendo V el volumen de muestra en ml y d el factor de dilución de la muestra.

Finalmente la actividad se expresó como Unidades de SOD por mg de proteína, para lo que previamente se había determinado la concentración de proteínas en el extracto crudo.

III.2.6.1.1. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ISOENZIMATICA SOD.

Es posible cuantificar la actividad de las diferentes isoenzimas de SOD, teniendo en cuenta la distinta sensibilidad que muestra

cada una de ellas frente al cianuro (Geller-Winge, 1983).

Las Cu,Zn-SODs son sensibles a concentraciones de CN^- 1-2mM, mientras que las Mn-SODs y Fe-SODs no se ven afectadas por este inhibidor. Por lo tanto es posible determinar la actividad correspondiente a las Cu,Zn-SODs por diferencia entre la actividad total y la obtenida en presencia de CN^- .

Por otra parte, también puede determinarse la actividad debida a las Fe-SODs llevando a cabo la reacción en presencia de H_2O_2 2 mM con lo que se inhibe tanto la actividad de las Fe-SODs como de las Cu, Zn-SODs quedando inalterada la actividad Mn-SOD.

Para ensayar el efecto del H_2O_2 se incubó la muestra con H_2O_2 2mM, en baño de hielo durante 20-30 minutos. Para inactivar la Cu,Zn-SOD se añadían a la mezcla de reacción 10 μl de KCN 0'1mM de forma que la concentración final en cubeta fuera de 1mM. Esta adición se realizaba antes de añadir la muestra.

Es conveniente añadir los inhibidores CN^- y H_2O_2 a los controles para contrarrestar posibles interferencias con algún componente de la mezcla de reacción.

La existencia de los diferentes isoenzimas se comprobó determinando la actividad isoenzimática en geles de poliacrilamida al 10% en los que previamente se había realizado una electroforesis de los extractos de mesocarpio.

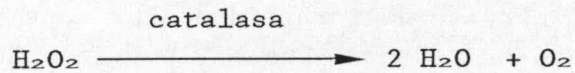
Tras la electroforesis, los geles se incubaban durante 30 min en tampón fosfato, cianuro potásico 1 mM o H_2O_2 1 mM. Una vez transcurrido este tiempo se incubaban en oscuridad durante 20 min con NBT, pasándolos posteriormente a una solución que contenía riboflavina $2'8 \times 10^{-5}$ M y TEMED 0'028 M. A continuación eran iluminados con luz ultravioleta hasta el desarrollo del color.

Este método de tinción está basado en el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973). El NBT se reduce por los radicales superóxido generados por la luz a partir de una riboflavina y TEMED. Los geles se tiñen uniformemente de azul a excepción de las zonas donde existe actividad SOD que quedan incoloras al permanecer en ellas el NBT en su estado oxidado.

III.2.6.2 CATALASA

La actividad catalasa se determinó siguiendo el método descrito por Bergmeyer (1974).

La catalasa actúa sobre el H_2O_2 descomponiéndola en H_2O y O_2 según la reacción:



El método se basa en la variación de la absorbancia a 240 nm como consecuencia de la disminución en la concentración de H_2O_2 . La concentración de H_2O_2 empleada como sustrato era 12'5 mM en un tampón fosfato potásico 0'1 M, pH 6'7 (con esta disolución se debe observar una absorbancia a 240 nm de $0'500 \pm 0'010$). Esta concentración debe ser inferior a la de saturación del enzima para evitar la rápida inactivación por oxidación de ésta.

La reacción comienza por adición de la muestra (60 μ l) determinándose la velocidad de disminución de absorbancia a 240 nm durante 2 min. La actividad enzimática se expresa en μ moles de H_2O_2 x min^{-1} x mg^{-1} de proteína.

La actividad enzimática se expresó en μ moles de H_2O_2 x min^{-1} x mg^{-1} de proteína.

III.2.6.3 PEROXIDASA

La determinación de actividad POD, se ha llevado a cabo siguiendo el método descrito por Pütter (1976), basado en la capacidad de la POD para transferir el H desde un donador al H_2O_2 , produciendo la oxidación del donador y la reducción del H_2O_2 .



Siendo DH_2 el donador de H y D su producto oxidado.

La especificidad que muestra la POD por el donador de H es muy baja siendo ésta mucho mayor con respecto al H_2O_2 . Sólo compuestos

que presenten el grupo -O-OH pueden actuar como sustratos de POD.

La velocidad de formación del compuesto oxidado nos da la medida de actividad POD. La concentración del donador influye considerablemente en la velocidad de reacción, mientras que cambios en la concentración de H₂O₂, no afectan apreciablemente a la velocidad.

El donador de H empleado en nuestro ensayo fue guayacol, y la medida espectrofotométrica se realizó a 436 nm. El color pardo del producto oxidado del guayacol no es estable, observándose a los 10 minutos de haberse formado una pérdida de intensidad. Por este motivo es preciso añadir suficiente cantidad de enzima, por lo que el tiempo de reacción no excedió de 5 minutos.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C, en un medio de ensayo constituido por tampón fosfato 75 mM, pH 6'7, guayacol 0'3 mM y H₂O₂ 12 mM, en un volumen final de 1 ml.

La reacción comenzaba con la adición de la muestra, midiéndose la velocidad de aparición del producto oxidado del guayacol durante 3 min. Los cálculos se realizaron de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ P} = \frac{\text{D.O.}/\text{min} \times \text{Vc}}{\epsilon \times \text{Vm} \times \text{P}}$$

Siendo Vc = volumen de ensayo, ϵ coeficiente de extinción molar del guayacol oxidado a 436 nm = 6'39 cm² x μmol^{-1} , Vm = volumen del extracto enzimático en el medio y P concentración de proteínas en mg x ml⁻¹.

III.2.7 DETERMINACION DE LIPIDOS

Las determinaciones lipídicas se han realizado en extractos clorofórmicos de mesocarpio de chirimoyas, preparados como se ha descrito previamente en el apartado III.2.3.3.

Se han realizado diferentes separaciones cromatográficas en capa fina y posteriormente, las bandas de lípidos separadas se han saponificado y metilado para el análisis del contenido en ácidos grasos por cromatografía de gases.

III.2.7.1. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Se ha empleado básicamente el método de Skipski (1969) con algunas modificaciones.

Las placas se han preparado en el laboratorio, extendiendo sobre soportes de vidrio, desengrasados con acetona, una suspensión acuosa homogénea de silica gel G-60 en una capa de 0'5 mm de espesor. Una vez preparadas, se dejaban secar a temperatura ambiente y se activaban por secado total en una estufa a 110°C durante 2 horas.

Las muestras se aplicaban con ayuda de una microjeringa en una línea lo mas estrecha posible a 1'5 cm del borde inferior y a 1 cm aproximadamente de los bordes laterales.

Se han utilizado diferentes fases móviles para la mejor separación de los componentes deseados. Así para el análisis de fosfolípidos totales y de ácidos grasos libres la fase móvil fue: Hexano:Eter etílico:Acido acético (80:20:1) en volumen, con BHT al 0'005%.

Para obtener una separación entre los distintos fosfolípidos se utilizó una fase móvil compuesta por Acetato de etilo:n-Propanol:Cloroformo:Metanol:KCl al 0'25% (25:25:25:10:9) en volumen, con BHT al 0'005%. En algunos casos se han realizado cromatografías bidimensionales utilizando como segunda fase móvil Cloroformo:Metanol:Amoniaco al 25%:Agua (90:54:5'5:5'5) en volumen y BHT al 0'005%.

Para la realización de las cromatografías se utilizaron campanas de vidrio previamente saturadas de la correspondiente fase móvil. La saturación se facilitaba recubriendo interiormente las campanas con hojas verticales de papel de filtro incrementando así la superficie de evaporación.

Las placas eran colocadas lo más verticalmente posible, concluyendo el desarrollo cromatográfico cuando la fase móvil se encontraba a 1 cm aproximadamente del borde superior. Una vez secas a temperatura ambiente eran reveladas en una campana saturada de vapores de yodo, apareciendo rápidamente bandas de color pardo amarillento correspondientes a las distintas fracciones lipídicas. Algunas bandas fueron identificadas según sus valores de Rf por comparación con patrones adecuados. (Resultados).

Las bandas se delimitaban y cuando se eliminaba el yodo eran

raspadas procediéndose a su posterior metilación o al análisis del contenido en fósforo.

En algunas ocasiones se realizaron fotodensitometrías de las placas inmediatamente después de sacarlas de la campana de yodo. Los densitogramas, obtenidos con un fotodensitómetro laser y el programa Gel Scan XL de Pharmacia, se utilizaron para cuantificar los distintos componentes lipídicos de acuerdo con sus áreas respectivas.

III.2.7.2. METILACION DE LOS ACIDOS GRASOS

Para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se ha seguido el método descrito por Morrison y Smith (1964).

Se ha empleado el compuesto trifluoruro de boro-metanol al 14% como agente encargado de efectuar la saponificación de los lípidos y la posterior metilación de los ácidos grasos.

Los extractos clorofórmicos de mesocarpio o las bandas obtenidas tras la cromatografía en capa fina, se resuspendieron en 0'4 ml de cloroformo conteniendo BHT al 0'005%, de donde se tomaban alícuotas de 50 μ l que se llevaban a tubos de metilación a los que se añadía bajo corriente de nitrógeno 1 ml de trifluoruro de boro-metanol al 14%. Los tubos se cerraron herméticamente y se agitaron durante 30 segundos para, a continuación, introducirlos en un baño a ebullición durante 30 min; pasado este tiempo se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Una vez fríos los tubos, se les añadieron 2 ml de n-heptano y 1 ml de agua destilada, se agitaron durante un minuto y se centrifugaron a 2800 xg durante 10 min. El sobrenadante obtenido se recogía con una pipeta pasteur y se llevaba a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

Las muestras desecadas y perfectamente cerradas, en ambiente de nitrógeno, se conservaron a -30°C hasta el momento de ser analizadas por cromatografía gas-líquido.

III.2.7.3. CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS

Para el análisis cromatográfico se ha empleado una columna semi-capilar de 30 m de longitud y 0'5 μ m de diámetro interno, rellena de una fase estacionaria DB-23 (50% cianopropil polixilano). Como fase móvil se ha utilizado nitrógeno a un flujo de 30 ml/min. La detección se ha realizado con un detector de ionización de llama alimentado con hidrógeno y aire a 30 ml/min y 400 ml/min respectivamente.

El programa de temperatura empleado para el desarrollo cromatográfico fue el siguiente: una temperatura inicial de 150°C que se mantenía durante 5 minutos, aumentándose a razón de 2°C/minuto hasta alcanzar 190°C y a partir de este valor se elevaba a 220°C a una velocidad de 3°C/min, manteniéndose 4 min a esta temperatura.

La muestra a analizar se disolvió en un volumen conveniente de hexano, realizándose en cada caso una inyección en el cromatógrafo de 0'5 μ l.

La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención de un patrón preparado con los ésteres metílicos de los ácidos grasos disponibles comercialmente y una solución AGPI nº2 que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos no disponibles comercialmente (Figura 5).

También se han identificado inequívocamente en extractos de chirimoyos por espectrometría de masas los siguientes ácidos grasos:

Saturados: C16, C17, C18, C20 y C22

Monoinsaturados: C16:1, C17:1, C18:1, C20:1 y C24:1

Poliinsaturados: C18:2w6, C18:3w6, C18:3w3, C18:4w3, C20:3w6, C20:4w6, C20:5w3, C22:3w6, C22:4w6 y C22:6w3

En muchas ocasiones el estudio de la evolución de un ácido graso concreto resulta poco indicativo de la importancia real que pueda tener. Por este motivo se recurre a índices generales, sobre todo cuando se trata de analizar la composición lipídica de membranas, ya que las características de una membrana no dependen

exclusivamente de la composición en un ácido graso, sino de la suma de todos los constituyentes y de las interacciones entre los mismos.

En este trabajo se han seleccionado los siguientes índices:

Saturados = Suma de los porcentajes relativos de todos los ácidos grasos saturados presentes en la muestra.

Insaturados = Suma de los porcentajes relativos de todos los ácidos grasos insaturados presentes en la muestra.

Monoinsaturados = Suma de los porcentajes relativos de todos los ácidos grasos monoinsaturados presentes en la muestra.

Poliinsaturados = Suma de los porcentajes relativos de todos los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la muestra.

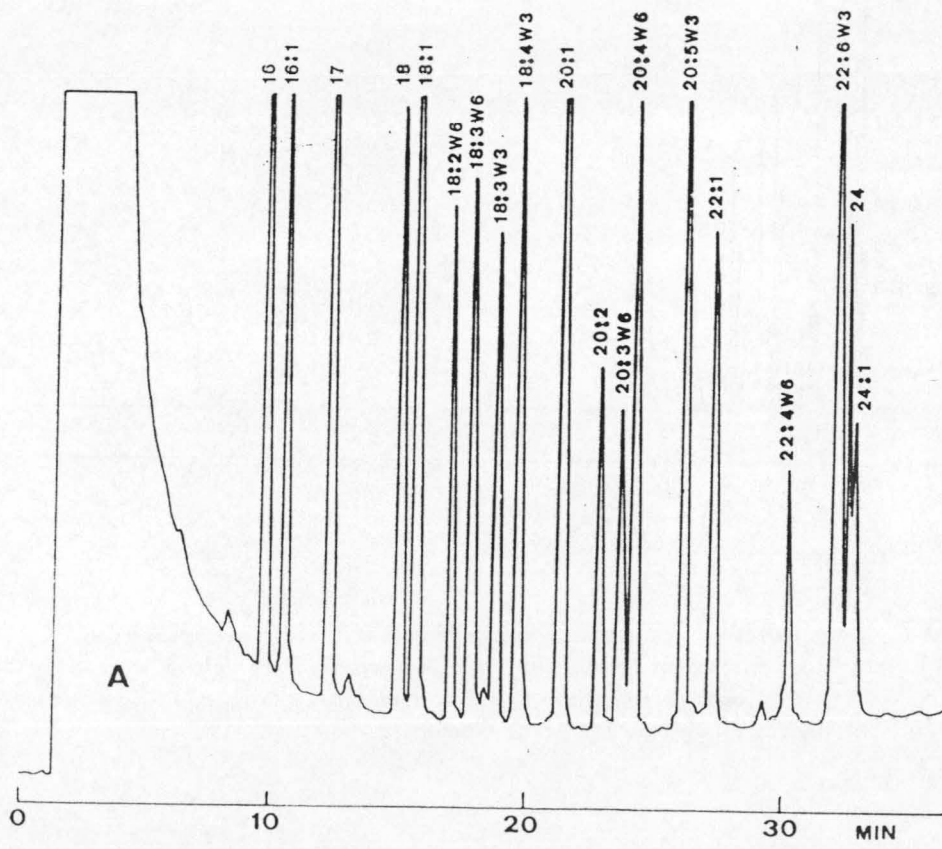
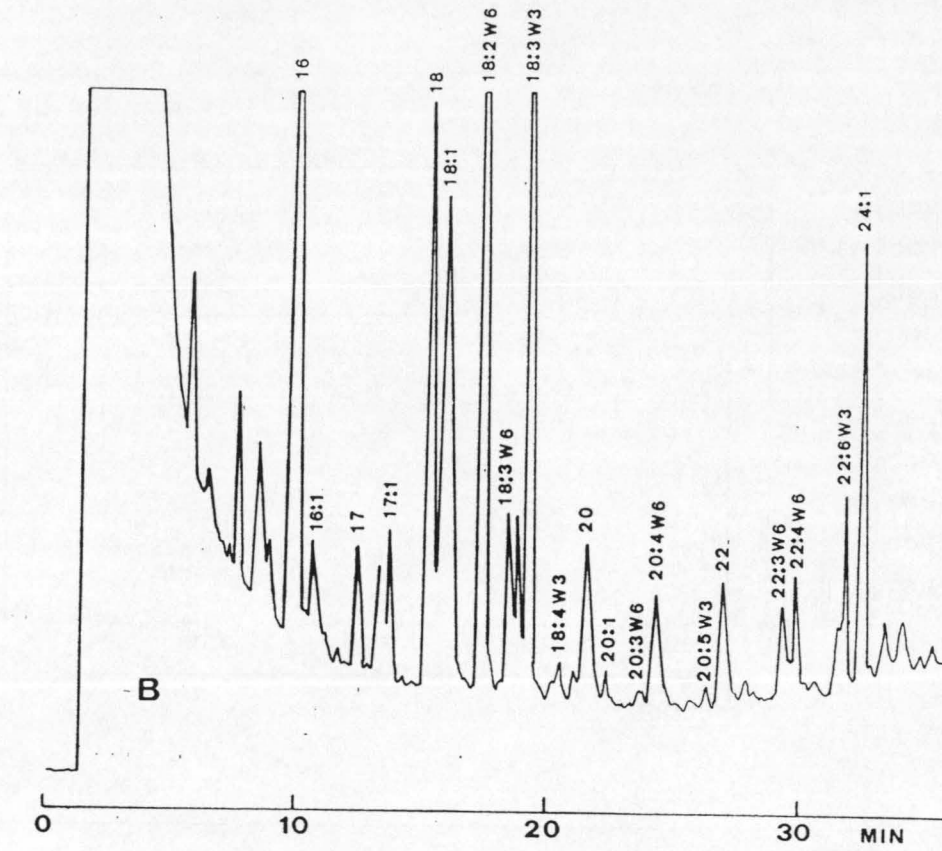
Índice de insaturación = Suma de los porcentajes relativos de cada uno de los ácidos grasos insaturados presente en la muestra multiplicado por el grado de insaturación correspondiente.

Serie w3 = Suma de los porcentajes relativos de todos los ácidos grasos de la serie w3 presentes en la muestra.

Serie w6 = Suma de los porcentajes relativos de todos los ácidos grasos de la serie w6 presentes en la muestra.

C18/C18:1 = Cociente entre los porcentajes relativos de los ácidos grasos indicados.

FIGURA 5.- Separación de ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido. (A) Separación de una disolución de patrones cromatográficos. (B) Separación típica en un extracto obtenido de mesocarpio de chirimoya.



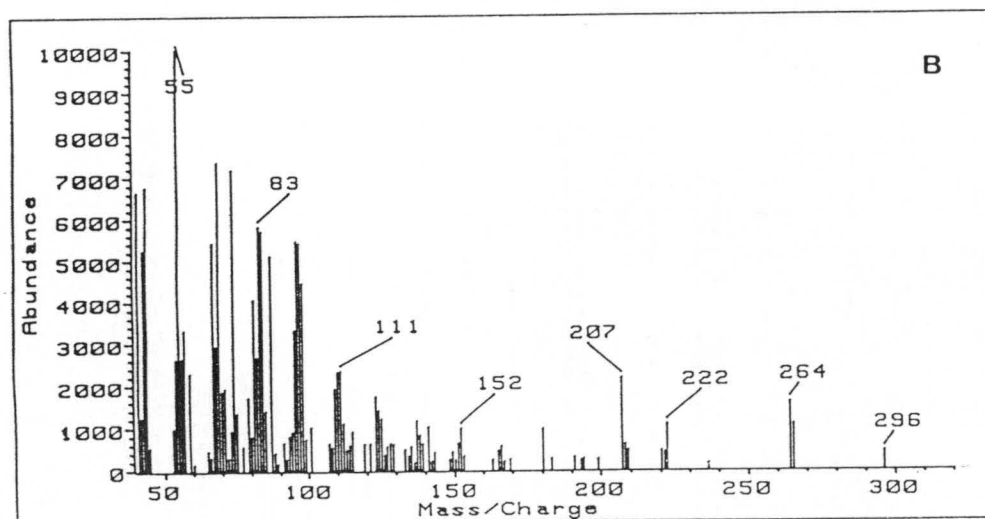
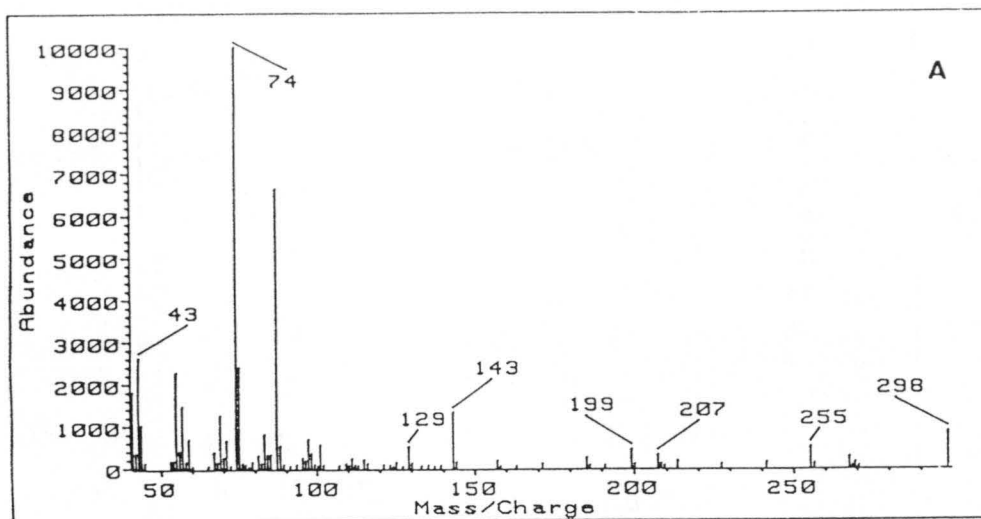
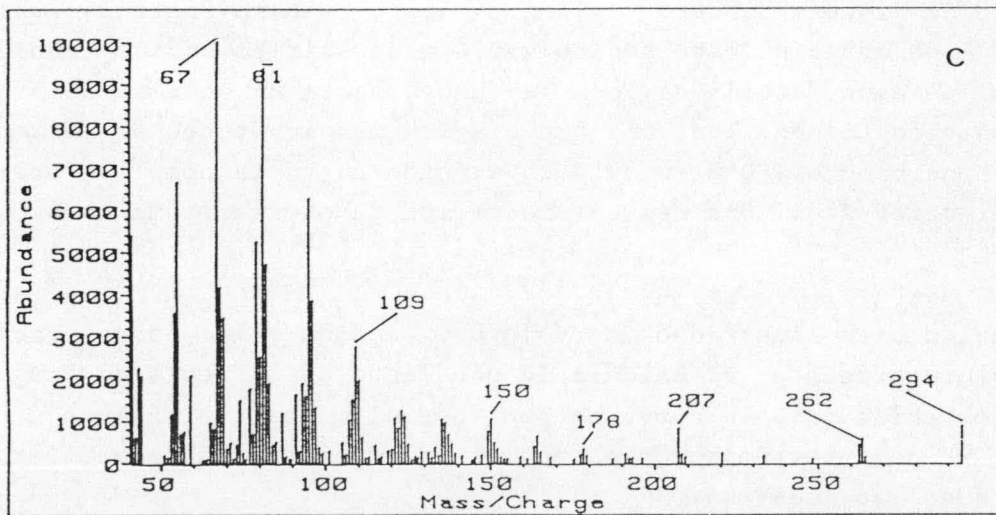
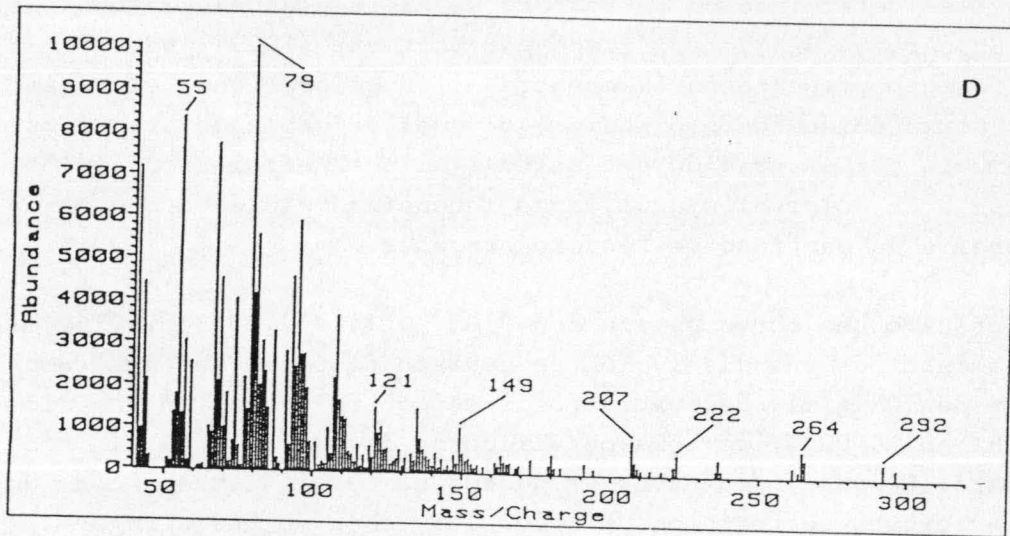


FIGURA 6.- Espectrometría de masas de ácidos grasos extraídos de mesocarpio de chirimoya. Se muestran sólo los espectros de ácidos grasos de 18 átomos de Carbono. (A) Acido esteárico. (B) Acido oléico. (C) Acido linoléico. (D) Acido linolénico.



III.2.7.4. DETERMINACION DE FOSFORO

Para la determinación de fósforo se ha seguido el método de Fiske y Subbarow (1925), modificado por Bartlett (1959), basado en que el fosfato presente en la muestra al reaccionar con el ácido molíbdico forma ácido fosfomolíbdico, el cual es capaz de reducirse selectivamente por la adición del ácido 1-amino-2naftol-3-sulfónico, dando lugar a una coloración azul, cuya intensidad medida a 830 nm es proporcional a la cantidad de fósforo presente.

Se preparó una curva patrón con 0'05, 0'1, 0'2, 0'3 y 0'4 ml respectivamente de una disolución de fosfato disódico con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Del extracto lipídico, resuspendido en cloroformo-BHT al 0'005%, se tomaron alícuotas de 10, 25 y 40 μl respectivamente. Se operó con tubos graduados de 10 ml, lavados con un detergente exento de fosfatos. A todos los tubos se les agregó 1'2 ml de ácido perclórico al 70%, dos gotas de molibdato amónico al 5% completándose hasta un volumen de 2 ml con agua bidestilada. Tras una suave agitación los tubos se taparon con bolas de cristal y se colocaron en un baño de arena a 180°C, manteniéndose a esta temperatura hasta que todos los tubos habían perdido completamente el color azul (aproximadamente 30 min).

Finalizada la digestión los tubos se sacaron del baño y una vez fríos se les añadió 0'4 ml de molibdato amónico al 5% y 0'4 ml del reactivo de Fiske y Subbarow (0'1 g de ácido 1-amino-2naftol-3-sulfónico, 6 g de metabisulfito sódico y 0'6 g de sulfito sódico anhidro en 50 ml de agua destilada), completándose hasta un volumen de 5 ml con agua bidestilada. Tras una breve agitación los tubos se introdujeron en un baño a 100°C durante 15 minutos hasta la completa aparición del color azul. Una vez enfriados los tubos, se midió su D.O. a 830 nm.

Debido a la linealidad entre la D.O. medida y la concentración de fósforo presente, se calcula la pendiente de la recta de regresión, obtenida para la curva patrón, por el método de mínimos cuadrados y por extrapolación obtenemos la concentración de fósforo presente en las muestras.

Teniendo en cuenta la relación entre el peso de tejido y el volumen del extracto lipídico total, así como el volumen de muestra, los resultados se expresan como μg de fósforo por g de tejido.

$$P = \frac{\mu\text{gP/D.O.} \times \text{D.O.} \times V_{\text{extracto lipídico}}}{V_{\text{muestra}} \times \text{g de tejido}}$$

Para la determinación del fósforo presente en los distintos fosfolípidos, se rasparon las manchas de las placas, una vez que se había eliminado el yodo, recogiendo la sílica sobre tubos en los que se operaba de forma idéntica, que en la determinación de fósforo total descrita anteriormente, a excepción de que transcurridos 15 min de incubación en el baño a ebullición se realizaba una centrifugación para evitar que la sílica presente interfiriese en la medida de D.O.

III.2.7.5. DETERMINACION DE MALONDIALDEHIDO

La determinación de malondialdehido se ha realizado siguiendo el método descrito por Ward et al., (1985).

Un gramo de tejido se homogeneizaba con 0'8 ml de H₂O conteniendo BHT al 0'001%. Conseguido el homogeneizado se añadían 6 ml de cloroformo:metanol 1:2 (v/v), conteniendo también BHT al 0'001%. Tras una agitación vigorosa durante 2 min se añadían 2 ml de HCl 0'01 N, agitándose nuevamente durante 1 min y se centrifugaba a 1500 xg. Se recogía 1 ml de la fase clorofórmica al que se añadían 3 ml de una mezcla compuesta por tricloroacético al 15% (p/v), TBA al 0'375% (p/v) y HCl 0'25 N en la proporción 1:1:1. A continuación los tubos se introducían en un baño a 85°C durante 50 min. Pasado este tiempo y una vez que los tubos alcanzaban la temperatura ambiente se procedía a una centrifugación a 1500 xg durante 5 min. La D.O. determinada a 535 nm se comparaba con la de una curva patrón de malondialdehido.

III.2.8. MICROSCOPIA

El estudio microestructural de los frutos de chirimoyo se ha realizado en porciones seleccionadas de los mismos, que responden a diferentes características morfológicas (Figura 7).

Los frutos en el estadio de maduración o conservación elegido se seccionaron, realizándose cortes cúbicos de 1 mm³ como máximo de

las siguientes zonas: Zona externa del epicarpio, zona interna del epicarpio, mesocarpio y endocarpio. En muchos casos, al no poder diseccionar fácilmente el endocarpio, se recogían zonas intercarpe-lares que englobaran, dentro de lo posible, los tejidos endocárpi-cos.

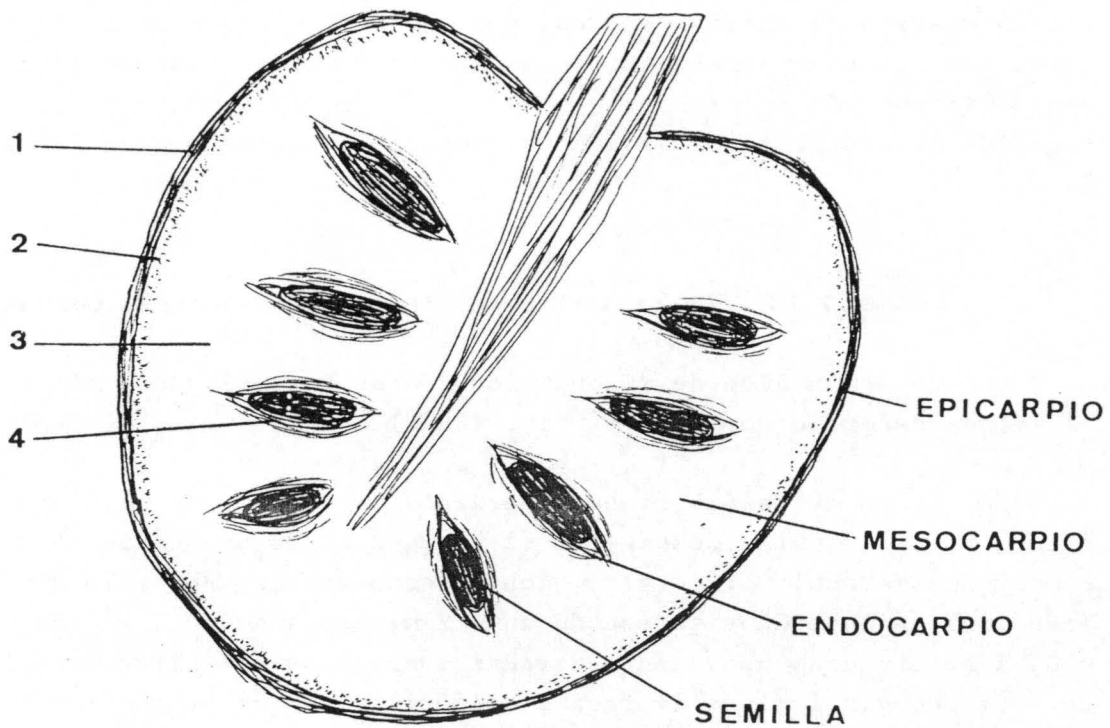


FIGURA 7.- Esquema de las diferentes zonas del fruto del chirimoyo. Las muestras para microscopía se han obtenido de la zona externa del epicarpio (1), de la zona interna del epicarpio, con aspecto granuloso, (2), del mesocarpio o pulpa blanca (3) y del endocarpio constituido por una lámina delgada a modo de camisa que rodea a las semillas (4).

La fijación se realizó a temperatura ambiente durante 18 horas, en una disolución de glutaraldehído al 2%, p-formaldehído al 2% en tampón cacodilato 50 mM, pH 6'8 para las muestras de mesocarpio y endocarpio, mientras que las procedentes de epicarpio se trataron con una disolución que contenía glutaraldehído al 6% y p-formaldehído al 2% en el mismo tampón.

Pasado este tiempo se procedió a un lavado con tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,8 durante 2 horas, que se renovaba cada 15 minutos.

A continuación, se llevó a cabo una postfijación en OsO_4 al 2%, ferrocianuro potásico al 1'5% en tampón cacodilato 0'1 M, pH 6'8, durante 2 horas a temperatura ambiente y en la obscuridad.

Las muestras ya fijadas se lavaron de nuevo en tampón cacodilato 0'1 M, pH 6'8, realizándose tres cambios de tampón y manteniéndose en el último durante toda la noche.

Seguidamente se sometieron a una deshidratación progresiva en un gradiente de etanol en las siguientes condiciones: etanol al 50%, 10 min; etanol al 70%, 10 min; etanol al 90%, 10 min; etanol al 100% tres cambios sucesivos de 5 min cada uno.

Para el estudio al microscopio óptico y al microscopio electrónico de transmisión las muestras deshidratadas se infiltraron con etanol:epon 1:1 (v/v) a temperatura ambiente durante 60 min, pasándose después a 37°C y manteniéndose en epon puro 2 horas. Transcurrido este tiempo se efectuó la polimerización manteniendo las placas a 37°C 16 horas y trasladándolas a 60°C durante 16 horas adicionales. Posteriormente las secciones se cortaron con un ultramicrotomo. Cortes de 0'5 μm de grosor se tiñeron con azul de toluidina y se visualizaron al microscopio óptico, mientras que para el microscopio electrónico de transmisión se hicieron cortes de 0'1 μm que se contrastaron por tinción con citrato de plomo y acetato de uranilo.

La preparación de las muestras para su observación por microscopía electrónica de barrido se realizó de manera similar. El tejido se sometió a un tratamiento análogo hasta su deshidratación en etanol al 100%.

Las muestras deshidratadas se mantuvieron en acetato de amilo durante 10 min, pasado este tiempo se sustituyó el acetato de amilo por dióxido de carbono y se desecaron por punto crítico en un Polaron E 3000.

Las muestras desecadas se congelaron en nitrógeno líquido y se fracturaron mediante un golpe con una cuchilla. Seguidamente se metalizaron con oro en un Sputtering Polaron E 5000, para ser observadas posteriormente.

III.2.9. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

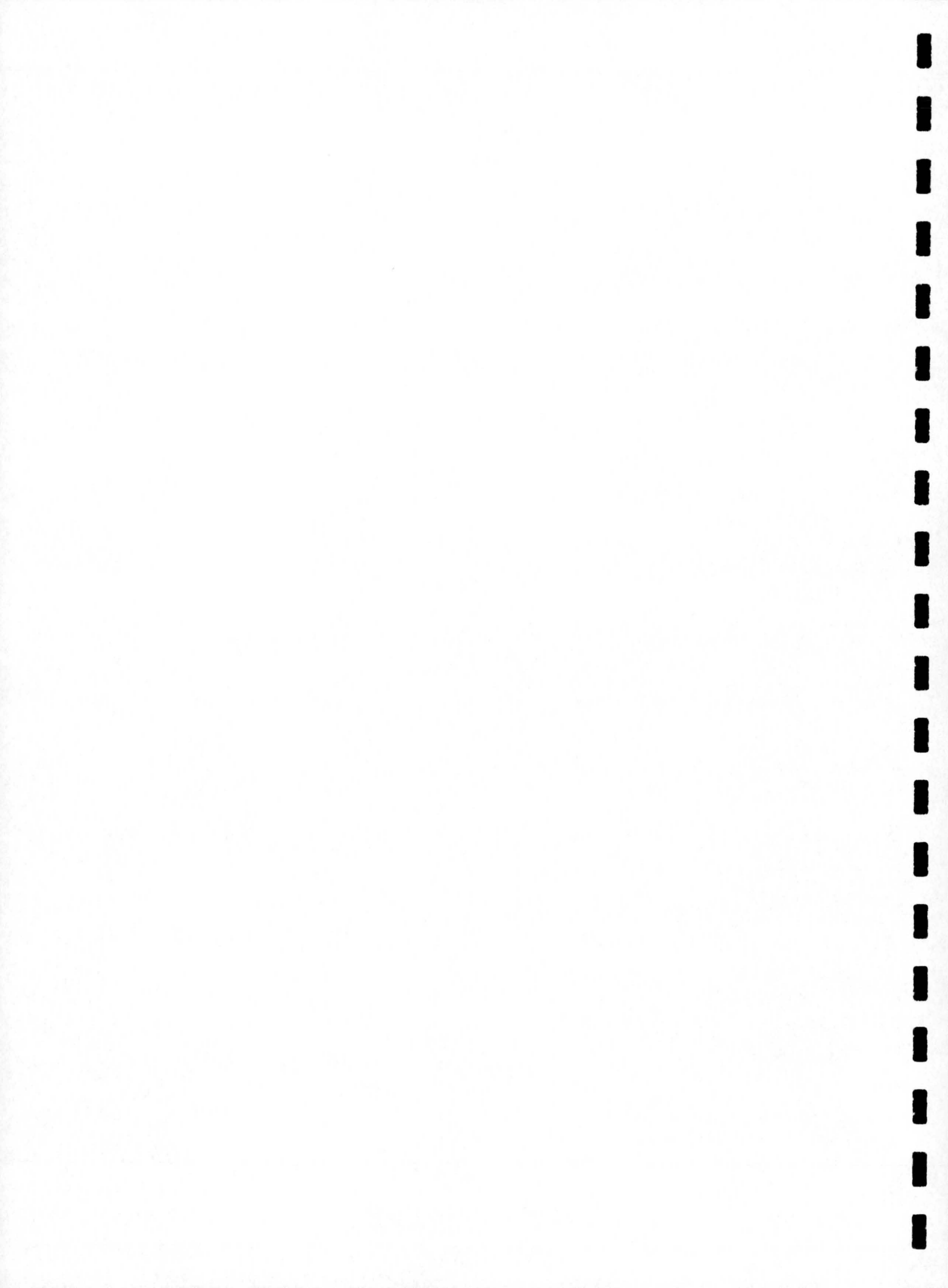
Los resultados se han analizado estadísticamente usando test de análisis de multivarianza (ANOVA) para el estudio de las diferencias significativas entre tratamientos.

Cuando se encontraban diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamientos, se han realizado comparaciones específicas entre las distintas muestras utilizando el test de ANOVA una vía.

En ocasiones se ha utilizado el test de la t de Student.

En todos los casos se ha considerado una diferencia estadísticamente significativa cuando $P < 0'05$.

IV. RESULTADOS



IV. RESULTADOS

IV. I. DETERMINACION DE SOLIDOS SOLUBLES TOTALES Y pH.

Durante la maduración de los frutos se produce una intensa síntesis de sustancias solubles, fundamentalmente azúcares y ácidos orgánicos, procedentes de la degradación de sustancias de reserva. La evolución en el contenido de sustancias disueltas y la acidez que presentan los jugos internos del fruto, a lo largo de la maduración a las diferentes temperaturas a que fueron sometidos, se conoce de forma inmediata al medir los sólidos solubles totales (S.S.T) y el pH como se ha descrito en el apartado III.2.2.

IV. I. I. SOLIDOS SOLUBLES TOTALES

Los valores de S.S.T. medidos en mesocarpio de chirimoya, en diferentes curvas de maduración quedan reflejados en la Tabla I.

TABLA I.- Evolución de Sólidos Solubles Totales en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	8'33±0'10	8'33±0'10	8'33±0'10	9'27±0'17
1	10'36±0'36***			
2	16'09±0'81***	11'42±0'10***		
3	20'84±0'67***		9'37±0'12***	8'41±0'40
4	22'18±0'50***	17'19±0'40***		
5	21'72±1'59***			
6	21'48±0'88***	19'50±0'43***		
7			11'72±0'82**	9'25±0'36
8		19'95±0'47***		
10		22'17±0'57***		
11			14'40±0'41***	9'61±0'27
15			15'31±1'31***	9'79±0'65
19			17'36±1'39***	11'09±0'57
23			19'97±1'21***	10'80±0'51*
27			22'05±0'52***	11'56±0'38**

Los resultados están expresados en °Brix, representan la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * p < 0'05, ** p < 0'01, *** p < 0'001 respecto a los valores iniciales.

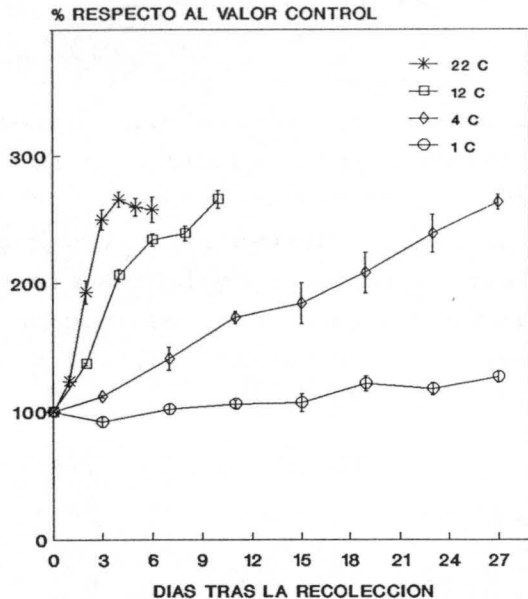


FIGURA 8.- Evolución porcentual respecto al valor inicial del contenido en sólidos solubles totales en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

Como puede observarse en la Figura 8, el contenido en sólidos solubles se incrementa rápidamente desde que comienza la maduración a 22°C hasta alcanzar un máximo el día cuarto. A partir de este día el valor se mantiene, tendiendo a decrecer. Si la maduración tiene lugar a 12°C, se observa el mismo fenómeno, si bien a esta temperatura la liberación de sólidos solubles es más lenta y el valor máximo no se alcanza hasta el día 10. Este retraso es más acusado en frutos conservados a 4°C, mientras que a 1°C apenas se registra una subida del 25% al final del experimento.

Comprobamos que cuando los frutos conservados a 4°C o a 1°C, son trasladados a 22°C, después de 11, 15 o 19 días de almacenamiento, se produce un incremento progresivo en la concentración de sólidos solubles llegando a producirse un máximo a los 4 o 5 días de maduración a 22°C, aunque observamos que si bien en el caso de los frutos procedentes de la conservación a 4°C el valor máximo obtenido coincide con el encontrado en los controles (madurados desde el comienzo a 22°C), incluso cuando se mantuvieron a 4°C hasta el día 19. No sucede lo mismo con los frutos procedentes de la conservación a 1°C donde los valores más altos están muy por debajo de los controles, (Figura 9).

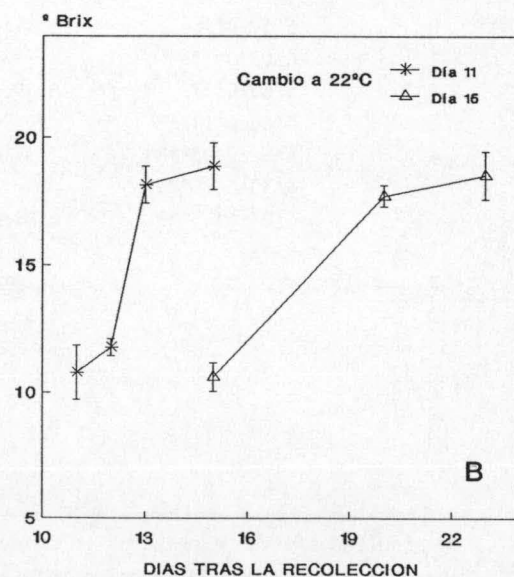
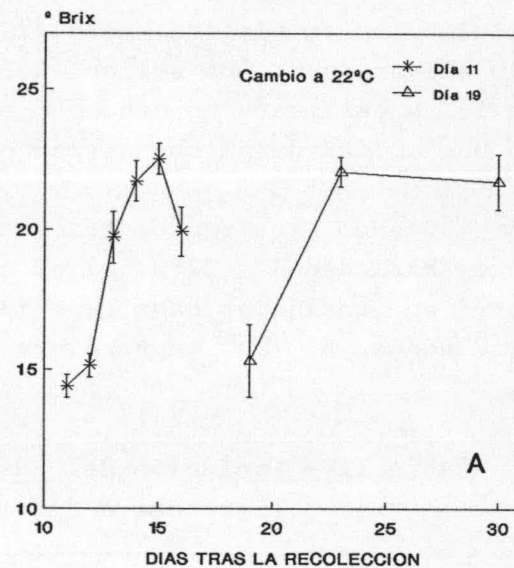
IV.1.2. pH

Las propiedades ácidas del mesocarpio de chirimoyas son debidas fundamentalmente a la presencia del grupo carboxilo en estado libre, aunque otros constituyentes de los frutos como fenoles también contribuyen con su carácter ácido a incrementar la acidez del fruto. Los ácidos orgánicos se encuentran normalmente disueltos en el citosol de la célula, bien libres o combinados en forma de sales, ésteres, glicósidos, etc.

Los ácidos orgánicos constituyen una fuente importante de energía en la respiración de la célula. El valor del pH dependerá en gran medida de la biosíntesis de ácidos orgánicos del ciclo tricarboxílico, que a su vez viene determinada por la disponibilidad de glucosa procedente fundamentalmente de la hidrólisis del almidón.

El pH de los frutos madurados a 20°C desciende, hasta alcanzar un valor mínimo, más o menos estable con una cierta tendencia a disminuir. El descenso del pH coincide con la elevación de los sólidos solubles totales.

FIGURA 9.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en sólidos solubles totales, medidos en °Brix, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).



En la Tabla II se representan los valores de pH medidos a lo largo de las curvas de maduración de diferentes experimentos a las distintas temperaturas ensayadas.

El pH del mesocarpio de los frutos medido aproximadamente 6 horas después de ser recolectados, presenta un valor que puede oscilar entre 6 y 6'3 unidades. Al producirse la maduración tanto a 22°C como a 12°C tiene lugar un descenso de alrededor de dos unidades de pH con respecto a la acidez de partida. Esta disminución se consigue más rápidamente a 22°C, que el cuarto día de la maduración muestra el mínimo valor, mientras que a 12°C el descenso es más lento y el mínimo no se alcanza hasta el décimo día, al igual que sucedía con la elevación de los sólidos solubles. Durante la maduración a 4°C y a 1°C experimenta un descenso muy lento y en cualquier caso inferior a una unidad de pH con respecto al valor inicial, (Figura 10).

Cuando los frutos tras haber permanecido 11 días a 4°C o a 1°C son trasladados a 22°C, el pH continúa descendiendo pero sus valores son en cualquier caso superiores a los obtenidos para los frutos madurados a la temperatura control. Si la conservación de los

TABLA II.- Evolución del pH en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	6'19±0'15	6'19±0'15	6'19±0'15	5'90±0'13
1	6'02±0'13			
2	5'69±0'17	6'19±0'04		
3	4'60±0'11***		6'29±0'05	5'92±0'04
4	4'37±0'03***	5'33±0'11*		
5	4'30±0'05***			
6	4'27±0'03***	4'84±0'05***		
7			5'91±0'14	6'02±0'13
8		4'72±0'05***		
10		4'38±0'04***		
11			5'37±0'07**	5'99±0'12
15			5'65±0'17*	5'97±0'13
19			5'62±0'07*	5'87±0'17
23			5'45±0'22*	5'83±0'18
27			5'85±0'04	5'79±0'08

Los resultados están expresados en unidades de pH, representan la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * p < 0'05, ** p < 0'01, *** p < 0'001 respecto a los valores iniciales.

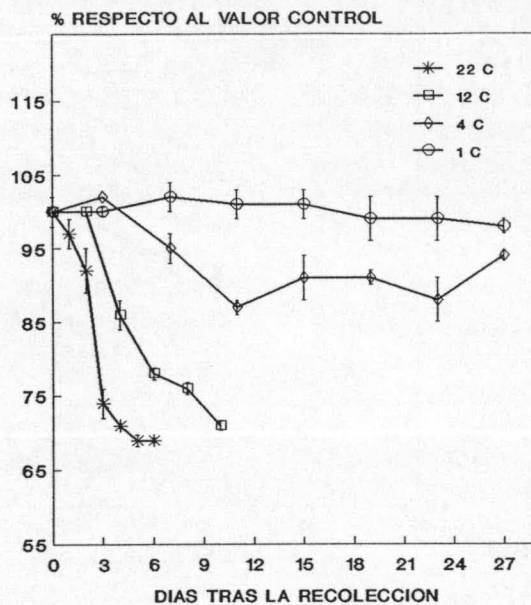


FIGURA 10.- Evolución porcentual respecto al valor inicial del pH en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

frutos a 4° o a 1°C se prolonga hasta el día 15, y es este día cuando se pasan a 22°C, no se observa un comportamiento de descenso, por el contrario la acidez del fruto disminuye, obteniéndose unos valores de pH que pueden ser superiores incluso a los encontrados para el día 0 (Figura 11).

IV. II DETERMINACION DE AZUCARES

El contenido en azúcares varía enormemente de unos frutos a otros e incluso de unas variedades a otras. El tipo de suelo y las condiciones climáticas durante la vida de la planta pueden influir decisivamente en la cantidad de azúcares presentes en el fruto.

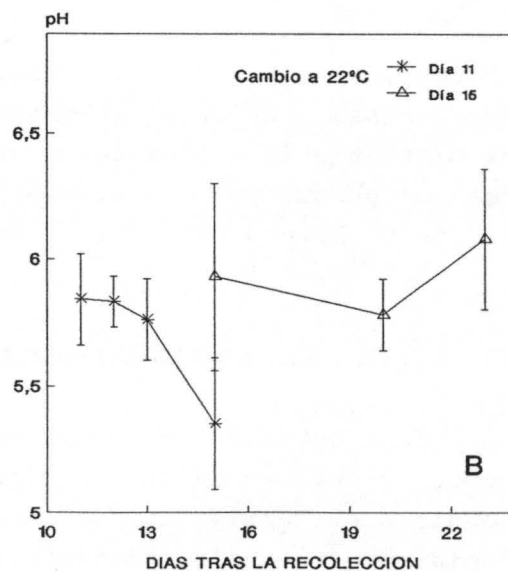
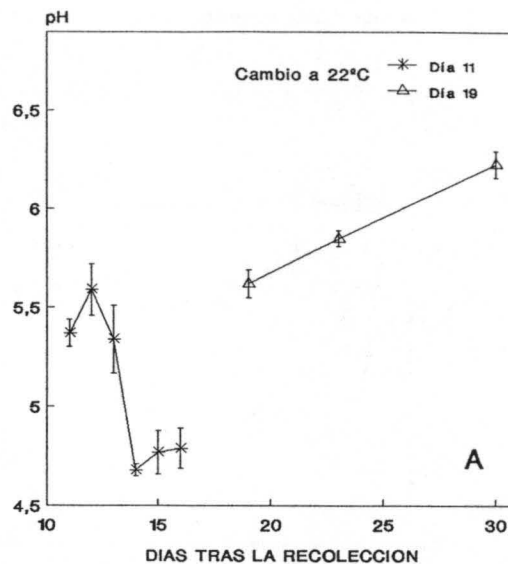
En los frutos climatéricos, como es el caso de la chirimoya, el contenido de azúcares puede sufrir grandes cambios entre la recolección y el grado de madurez óptimo para el consumo. En términos generales sacarosa, glucosa y fructosa son los principales azúcares encontrados en todos los frutos aunque pueden aparecer otros en cantidades muy inferiores a estos, o bien hallarse sólo en trazas. El contenido normal de azúcares en los frutos es del 5-10% del peso fresco de la parte comestible del fruto, encontrándose excepciones

por arriba y por debajo de estos valores.

Para determinar la evolución de los azúcares presentes en el mesocarpio de chirimoya, se diseñaron curvas de maduración a diferentes temperaturas, tomando $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ como temperatura control, por ser ésta la temperatura de las regiones de procedencia de los frutos. Siendo 12°C , 4°C y 1°C el resto de las temperaturas estudiadas. La humedad relativa se mantuvo en $85\% \pm 10\%$, en todos los casos.

Los frutos conservados a 4°C o 1°C durante un determinado tiempo se trasladaron a 22°C , al igual que se había hecho para el estudio del pH y contenido en SST, con objeto de poder estudiar la evolución de los azúcares presentes en el

FIGURA 11.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del pH, cuando los frutos maduraban a 22°C , tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).



mesocarpio, tras el enfriamiento y su posterior maduración a temperatura control. Se eligieron como periodos de enfriamiento 11 o 19 días para los frutos conservados a 4°C y 11 o 15 días para los frutos conservados a 1°C . El interés de estos tratamientos estriba en que, como ha sido descrito para otros frutos, los daños por frío pueden ser reversibles y dependen directamente de la duración del periodo de enfriamiento.

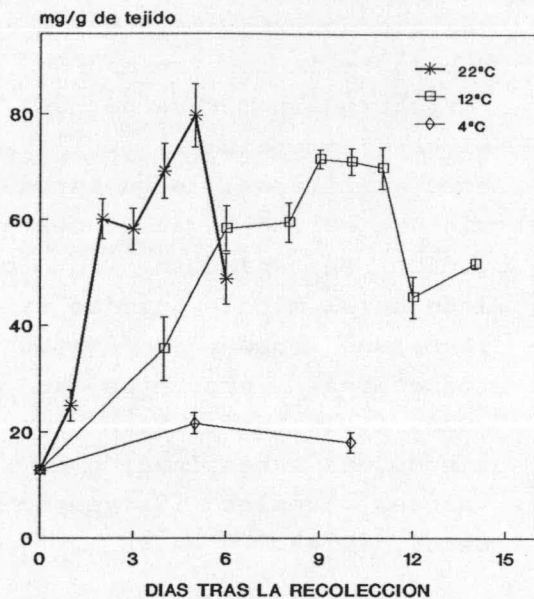


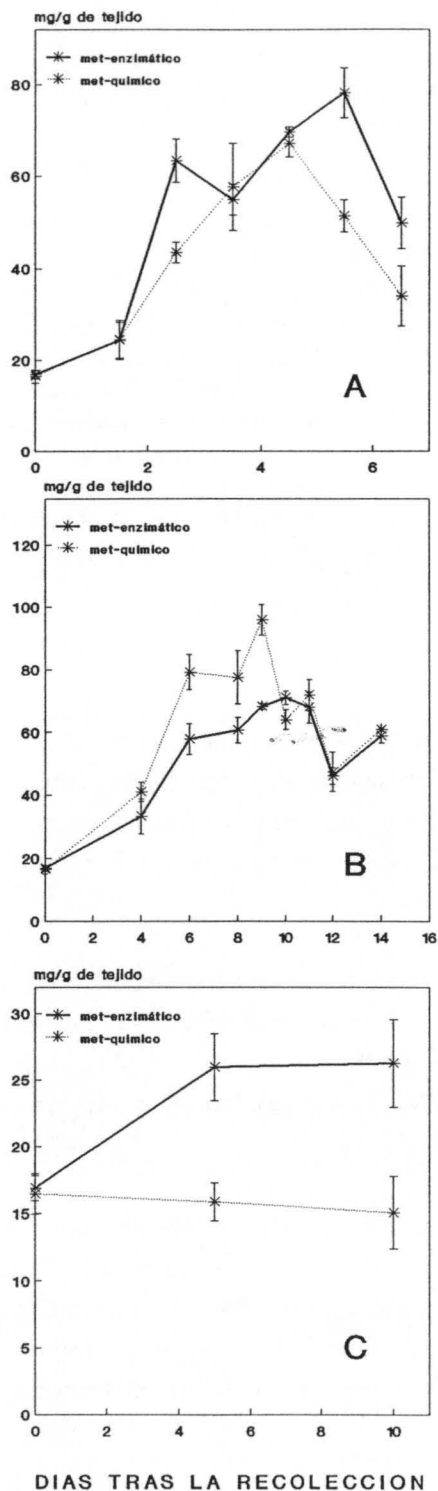
FIGURA 12.- Evolución del contenido en glucosa, expresado en mg/g de tejido húmedo, en el mesocarpio de chirimoyas almacenadas a diferentes temperaturas durante su maduración. La glucosa fue determinada por un método enzimático.

En primer lugar llevamos a cabo una determinación enzimática de los azúcares presumiblemente presentes en el mesocarpio de chirimoya, por ser común su hallazgo en otros frutos tropicales. Siguiendo los métodos descritos en el apartado III.2.4, evaluamos el contenido en glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa.

No se encontró maltosa en ningún estado de la maduración, lo que parece indicar que el almidón no se transforma en maltosa. La glucosa (Figura 12), sí que está presente en todas las etapas de la maduración, presentando perfiles crecientes a las distintas temperaturas estudiadas.

La determinación de fructosa planteaba muchos problemas y cuando se compararon los resultados obtenidos por dos métodos diferentes éstos no eran coincidentes (Figura 13). En la determinación colorimétrica empleando resorcinol, la glucosa y otros compuestos reductores pueden interferir produciendo errores (Bernt y Bergmeyer, 1974).

Este problema es mucho más acentuado en la determinación de



sacarosa (Figura 14), donde la diferencia entre los resultados obtenidos con ambos métodos es más que notoria. Esto puede ser debido a la contaminación con fosfohexosaisomerasa de los enzimas comerciales utilizados como auxiliares, lo que produciría una sobreestimación del contenido en sacarosa. Por otro lado en el método químico utilizado, una abundancia de azúcares reductores, presentes en la muestra, interferirían produciendo una subestimación de los valores reales (Bergmeyer y Bernt, 1974).

Por estos motivos se procedió a la separación y cuantificación de los azúcares por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC", (esta técnica fue descrita en el apartado III.2.4.) Todos los resultados que vienen a continuación se obtuvieron con esta técnica, la que también permitió corroborar la ausencia de maltosa en nuestras muestras, que no habíamos podido detectar por métodos enzimáticos.

FIGURA 13.- Evolución del contenido en fructosa, expresado en mg/g de tejido húmedo, en el mesocarpio de frutos madurados a 22°C (A), 12°C (B) y 4°C (C). Las determinaciones se han realizado por un método enzimático y por un método químico (Apartado III.2.4.2.).

IV.2.1. SACAROSA

La sacarosa no es uno de los azúcares mayoritarios en chirimoya, a diferencia de otros frutos. Sus niveles son bajos tras la recolección presentando un pequeño pico máximo el segundo día durante la maduración a 22°C. Este pico coincide con la máxima degradación de almidón.

En la tabla III se representa la concentración de sacarosa expresada en mg/g de mesocarpio húmedo de chirimoyas conservadas a las distintas temperaturas experimentales.

Como puede observarse en la Tabla III, cuando la maduración se produce a 12°C o a 4°C, también se alcanza un pico en la concentración de sacarosa, con valores máximos semejantes a los obtenidos durante la maduración a 22°C, aunque obviamente el pico máximo se encuentra muy desplazado, apareciendo el día 4 cuando la maduración era a 12°C

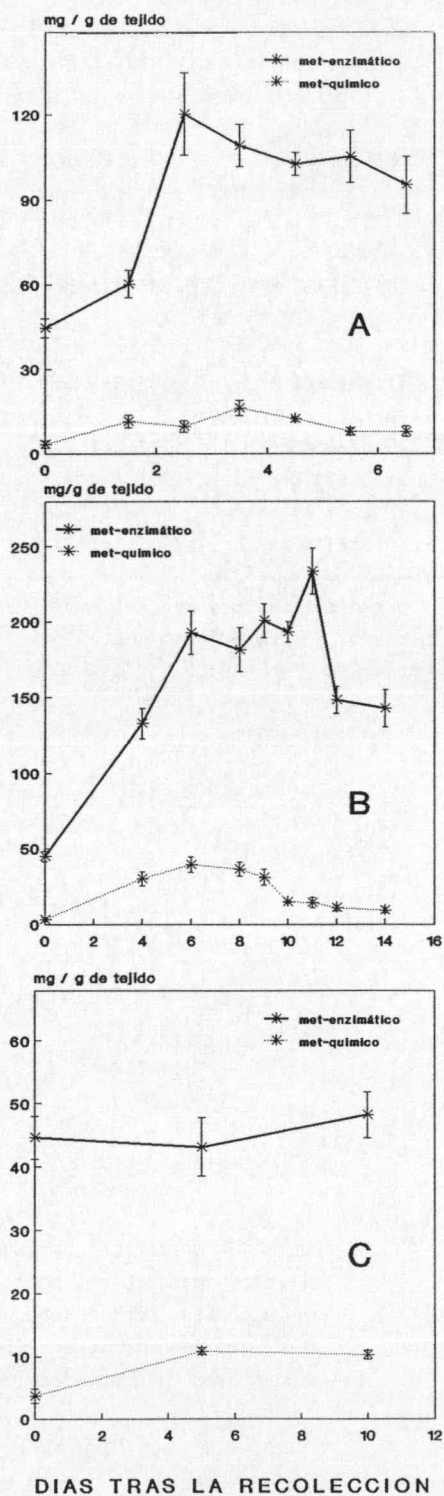


FIGURA 14.- Evolución del contenido en sacarosa, expresado en mg/g de tejido húmedo, en el mesocarpio de frutos madurados a 22°C (A), 12°C (B) y 4°C (C). Las determinaciones se han realizado por un método enzimático y por un método químico (Apartado III.2.4.3.).

TABLA III.- Concentración de sacarosa en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	5'08±0'40	5'08±0'40	5'08±0'40	8'97±1'67
1	10'62±0'92			
2	28'32±3'24*	18'91±1'95*		
3	20'72±1'64*		8'10±1'01	9'01±2'07
4	17'74±1'97*	29'60±3'49**		
5	16'02±1'44*			
6	9'37±0'83*	20'53±0'89***		
7			18'73±2'63***	8'60±1'17
8		15'06±1'59*		
10		17'33±1'95*		
11			31'98±1'61***	10'48±1'36
12		12'04±3'09		
15			25'87±6'88***	12'60±1'95
19			31'53±1'57***	16'24±0'96*
23			17'56±4'25	14'99±1'32
27			6'53±1'81	16'44±1'81

Los resultados están expresados en mg de azúcar por gramo de tejido y son la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * p < 0'05, ** p < 0'01, *** p < 0'001 respecto a los valores iniciales.

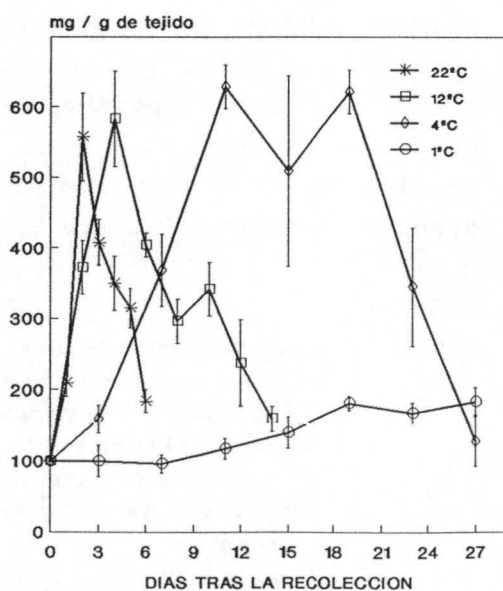
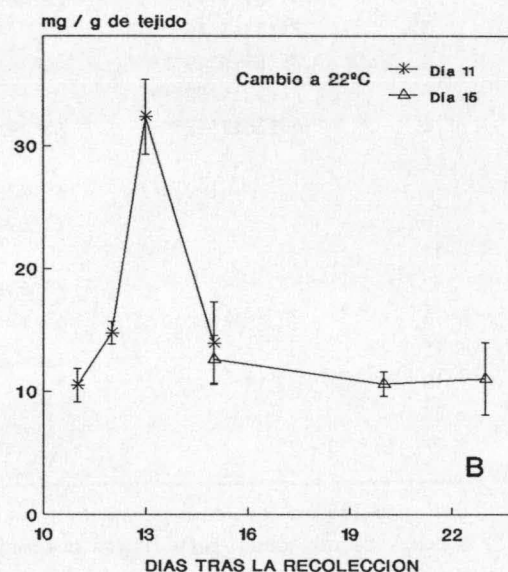
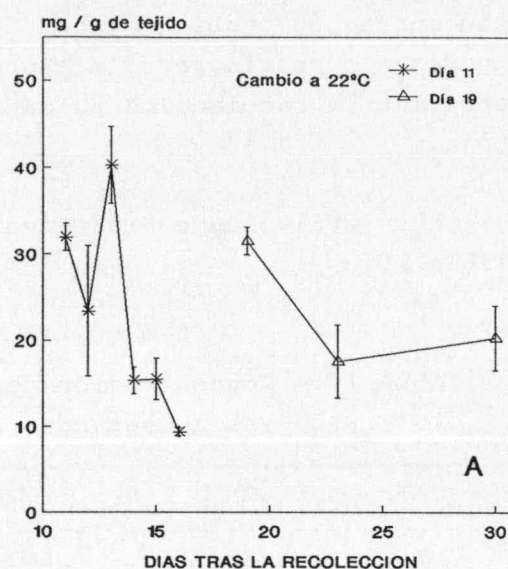


FIGURA 15.- Evolución porcentual, respecto al valor inicial, del contenido en sacarosa, determinada por HPLC, en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

y siendo mucho más amplio entre los días 11 y 19 cuando se conservaban los frutos a 4°C. Sin embargo, cuando los frutos se almacenaban a 1°C no llega a producirse el acúmulo de sacarosa, si bien, los valores se incrementan al doble de los controles, permaneciendo en ese margen durante toda la duración del experimento.

Cuando los frutos conservados a 4°C eran trasladados a 22°C, la respuesta en los niveles de sacarosa se acerca a la encontrada para la maduración en condiciones control, registrándose un máximo dos días después de permanecer a 22°C y decayendo hasta valores muy bajos al final de la senescencia.

FIGURA 16.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en sacarosa, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).



El mismo fenómeno se observa para la conservación a 1°C y su posterior trasvase a 22°C; sin embargo en este caso los niveles de sacarosa alcanzados son significativamente menores que en el caso anterior.

IV.2.2 GLUCOSA

Los monosacáridos mayoritarios encontrados en las chirimoyas son la glucosa y la fructosa, detectándose pequeñas diferencias de concentración entre ambos. Sin embargo, durante la maduración el incremento sufrido por la glucosa con respecto a los niveles presentes tras la recolección es algo mayor al experimentado por la fructosa.

La evolución en los niveles de glucosa queda reflejada en la Tabla IV.

TABLA IV.- Concentración de glucosa en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	18'43±0'87	18'43±0'87	18'43±0'87	16'33±2'28
1	21'25±0'67*			
2	39'29±1'95***	28'48±1'43**		
3	71'53±3'79***		20'40±1'09	18'38±3'92
4	75'85±3'19***	41'16±3'53**		
5	74'52±1'02***			
6	66'36±1'42***	65'19±0'38***		
7			27'25±3'65	15'81±1'11
8		65'72±1'53***		
10		71'69±3'15***		
11			46'25±8'88	12'48±2'27
12		73'61±1'80***		
14		63'89±0'71***		
15			40'17±5'89**	12'60±1'95
19			45'56±4'52**	28'50±5'70
23			48'38±8'63	24'55±4'07
27			50'45±1'73**	23'99±4'76

Los resultados están expresados en mg de azúcar por gramo de tejido y son la media \pm S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * $p < 0'05$, ** $p < 0'01$, *** $p < 0'001$ respecto a los valores iniciales.

Cuando la maduración se produce a 22°C, la concentración de glucosa se incrementa progresivamente hasta alcanzar un máximo el 4º día tras la recolección, produciéndose a continuación un suave descenso. Si la maduración tiene lugar a 12°C el incremento es más lento, no haciéndose patente el máximo valor hasta el décimo día tras la recolección, pero alcanzándose en este momento valores

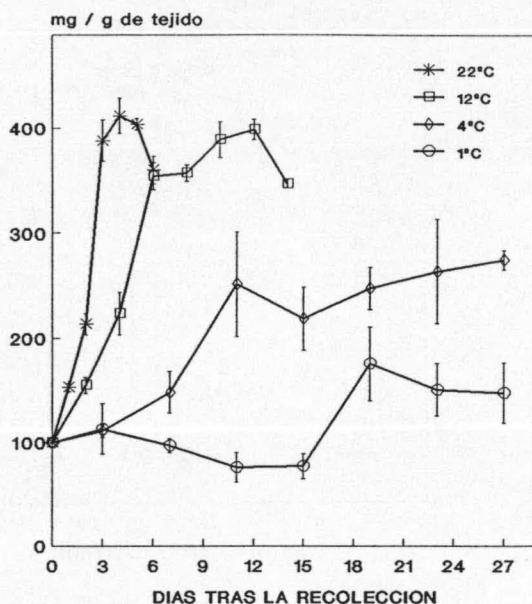


FIGURA 17.- Evolución porcentual, respecto al valor inicial, del contenido en glucosa, determinada por HPLC, en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

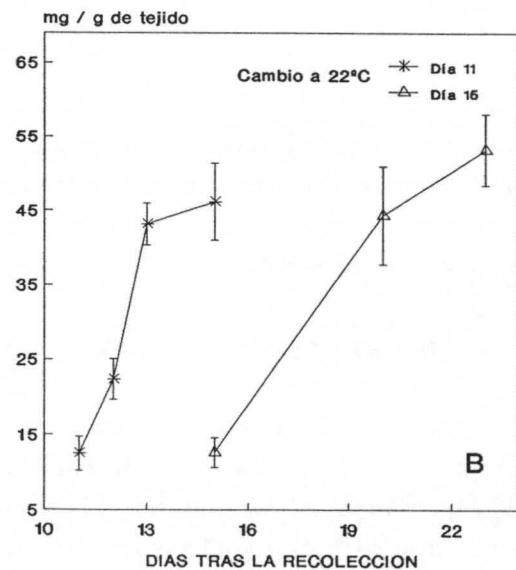
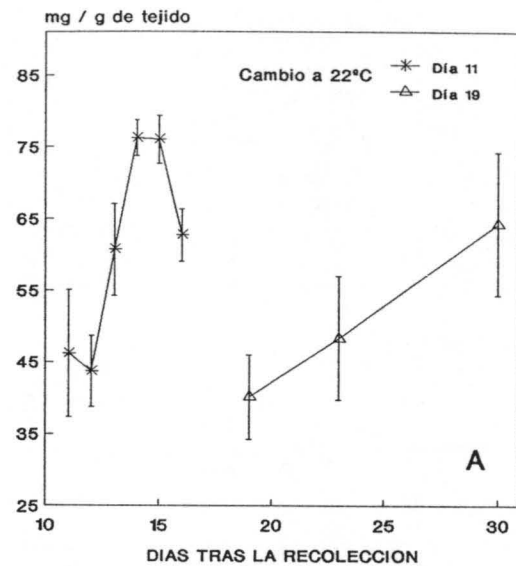
comparables al máximo obtenido a 22°C. Al producirse la maduración a 4°C hay un incremento progresivo aunque no tan pronunciado como el observado a 22°C y a 12°C. La misma tendencia se observa cuando los frutos maduraron a 1°C.

En la figura 17, podemos ver cómo al producirse la maduración a 22°C o a 12°C, los niveles de glucosa se incrementan 4 veces con respecto al valor inicial, mientras que cuando la maduración tiene lugar a 4°C, la concentración de glucosa sólo llega a superar en 2'74 veces el valor de partida. En la maduración a 1°C los niveles alcanzados tan sólo superan en 1'47 veces el valor encontrado tras la recolección. Por tanto la maduración a bajas temperaturas no conlleva sólo un enlentecimiento sino también una disminución en la producción neta de glucosa.

Estudiamos también cómo podía afectar en la evolución de los niveles de glucosa la conservación de los frutos a 4°C y su posterior maduración a 22°C. Para ello los frutos que habían permanecido 11 días a 4°C se trasladaron a 22 °C, observándose un incremento hasta llegar a un máximo que coincidía con el tercer día de ser

mantenidos a la nueva temperatura, produciéndose a continuación un lento descenso, reproduciendo pues el mismo patrón de comportamiento sufrido a 22°C y a 12°C. Si el trasvase de 4°C a 22°C se producía el día 19, igualmente puede observarse una subida en los niveles de glucosa, aunque siempre con valores inferiores a los máximos encontrados para los controles. Cuando los frutos conservados a 1°C se trasladan el día 11 o el día 15 a 22°C, se reproduce el mismo comportamiento que tras el almacenaje a 4°C, si bien en este caso la concentración máxima alcanzada se encuentra muy por debajo de la conseguida en la maduración a 22°C (Figura 18).

FIGURA 18.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en glucosa, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).



IV.2.3 FRUCTOSA

Tras la recolección, la fructosa es el azúcar que se encuentra en mayor concentración en el mesocarpio de chirimoya. Los niveles de este azúcar van aumentando gradualmente a medida que la maduración

avanza, siendo a lo largo de la maduración el azúcar mayoritario.

La evolución en los niveles de fructosa queda reflejada en la Tabla V. Cuando la maduración tiene lugar a 22°C la concentración de fructosa se incrementa rápidamente hasta el tercer día después de la recolección. A partir de este momento su incremento es constante pero más tenue. A 12°C el comportamiento, aunque más lento, es idéntico al observado para 22°C. Si la maduración se produce a 4°C o a 1°C de nuevo se observa un incremento progresivo, pero en ambos casos los valores máximos alcanzados son muy inferiores a los encontrados a 22° y a 12°C.

En la figura 19 podemos observar cómo a 22°C se llega a un valor 3'27 veces por encima del valor inicial, siendo este incremento algo mayor a 12°C, si bien a esta temperatura los análisis se prolongaron hasta el día 14 tras la recolección, mientras que a 22°C se detuvieron el día 6, momento en que los frutos estaban sobremaduros.

TABLA V.- Concentración de fructosa en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	23'76±1'09	23'76±1'09	23'76±1'09	22'34±2'67
1	27'11±1'40			
2	40'51±1'82**	29'36±1'36		
3	72'27±3'84**		23'59±2'71	23'14±4'04
4	77'24±2'26**	38'58±3'88*		
5	77'56±1'59**			
6	77'73±2'24**	68'27±2'19**		
7			32'71±2'75*	20'68±1'74
8		67'15±0'72**		
10		78'10±2'44**		
11			48'24±8'13	16'23±2'40
12		101'80±2'80**		
14		107'59±0'73**		
15			45'24±5'38	21'77±4'28
19			50'70±6'40*	36'36±5'95
23			53'89±9'47	32'96±5'08
27			59'98±9'60*	27'90±6'04

Los resultados están expresados en mg de azúcar por gramo de tejido y son la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * p < 0'05, ** p < 0'01, *** p < 0'001 respecto a los valores iniciales.

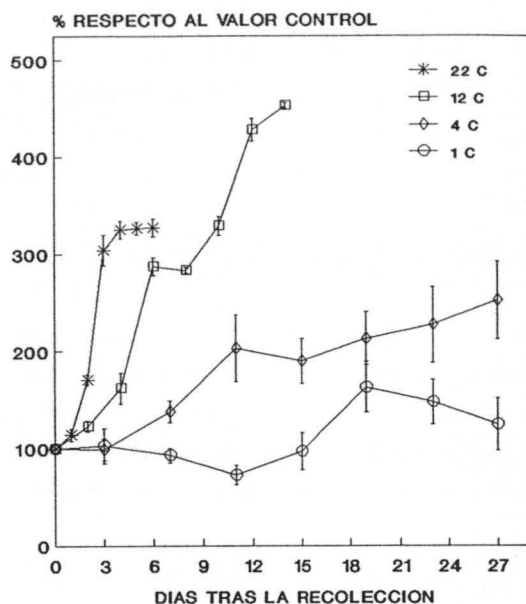


FIGURA 19.- Evolución porcentual, respecto al valor inicial, del contenido en fructosa, determinada por HPLC, en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

Si la maduración se efectúa a 4°C o a 1°C los niveles de fructosa sólo se incrementan en 2'52 y 1'63 veces respectivamente, sobre el valor de partida. A diferencia del comportamiento de la glucosa, que tras alcanzar el valor máximo tiende a descender, en el caso de la fructosa el incremento es constante.

Si los frutos conservados a 4°C, 11 días tras su recolección se trasladaban a 22°C, la evolución en el contenido de fructosa se incrementaba hasta superar incluso los valores controles. Cuando el paso a 22°C se producía el día 19 tras la recolección el nivel se incrementaba también pero por debajo de los anteriores. Cuando los frutos conservados a 1°C eran trasladados a 22°C los niveles de fructosa se incrementaban gradualmente, pero sin llegar a alcanzar los valores máximos (Figura 20).

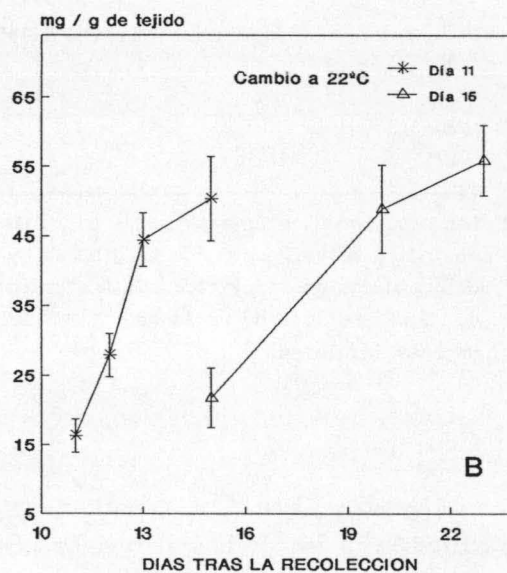
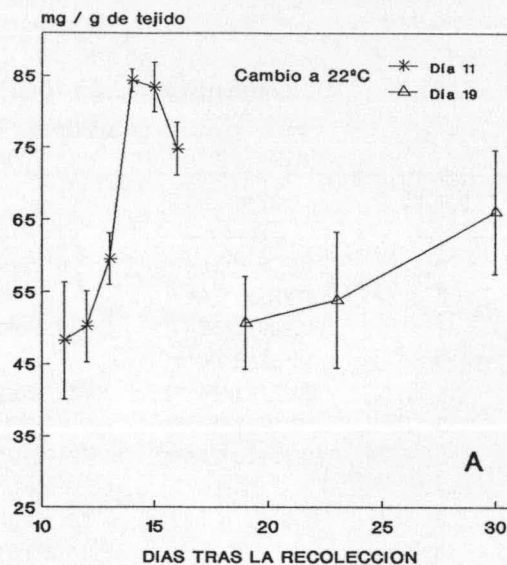
IV.2.4 PICO 1

En la cromatografía líquida de alta presión, además de fructosa, glucosa y sacarosa detectamos la presencia de otros dos picos,

los denominamos Pico 1 y Pico 5. El Pico 1 es el que presenta el menor tiempo de retención, apareciendo justo inmediatamente antes que la sacarosa, siendo presumiblemente un azúcar aminado.

Los valores de concentración del pico 1 quedan reflejados en la Tabla VI. Como podemos observar a 22° tras un pequeño pero significativo descenso el primer día de la maduración, aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor máximo el cuarto día tras la recolección, hecho que se corresponde con la mayor abundancia de sólidos solubles ocurrida también el cuarto día de la maduración, y desciende suavemente a partir de este valor.

FIGURA 20.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en fructosa, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).



A 12°C su comportamiento es semejante, la concentración se incrementa más lentamente, pero el ascenso no se detiene, elevándose 2'5 veces por encima del valor control y sobrepasando el máximo de concentración presente a 22°C. Cuando la maduración tiene lugar a 4°C o a 1°C salvo pequeñas oscilaciones en uno y otro sentido, no

significativas estadísticamente, la concentración se mantiene constante a todo lo largo del periodo de conservación estudiado (Figura 21).

TABLA VI.- Concentración del pico 1 en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	10'05±0'54	10'05±0'54	10'05±0'54	10'05±0'54
1	7'85±4'20*			
2	15'29±3'55	10'41±0'73		
3	18'37±2'00**		8'19±0'82	9'57±0'63
4	20'27±1'74***	10'25±1'56		
5	19'04±1'12***			
6	19'09±0'76***	12'96±0'61*		
7			10'79±2'25	9'33±0'60
8		16'89±0'96***		
10		16'67±0'65***		
11			12'55±1'99	9'64±1'02
12		21'19±1'83***		
14		25'21±1'17***		
15			10'38±0'95	8'99±0'83
19			10'12±0'59	9'41±0'65
23			8'94±1'40	9'08±1'05
27			9'79±1'99	9'76±0'56

Los resultados están expresados en mg de azúcar por gramo de tejido, tomando como patrón el índice de refracción de la glucosa, y son la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * $p < 0'05$, ** $p < 0'01$, *** $p < 0'001$ respecto a los valores iniciales.

Cuando los frutos conservados a 4°C, se trasladaron a 22°C la evolución en los niveles de esta sustancia no sigue un comportamiento lineal, experimentando un importante descenso un día después de ser sometidos a la nueva temperatura para después incrementarse llegando a alcanzar valores equivalentes a los máximos detectados a 22°C. Si la conservación a 4°C se prolongaba hasta el día 15 y en esta fecha se pasaban a 22°C, se observó igualmente una disminución inicial seguida de un incremento mucho menos pronunciado que en el caso anterior (Figura 21).

Los frutos que se habían conservado a 1°C, 11 o 15 días, al ser

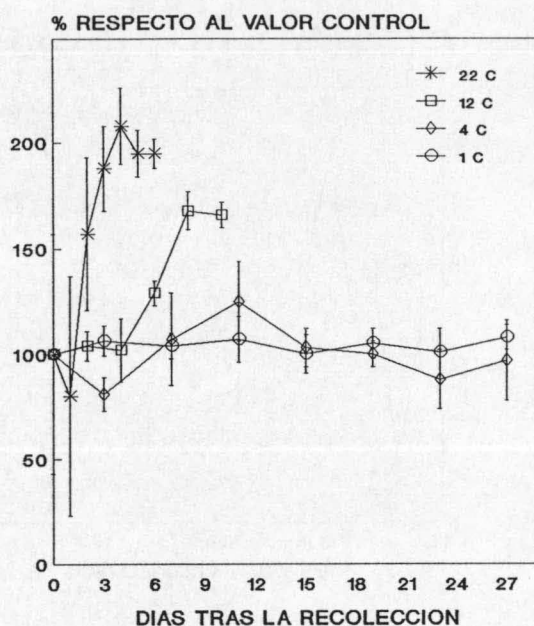


FIGURA 21.- Evolución porcentual, respecto al valor inicial, del contenido en pico 1, determinado por HPLC, en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

trasladados a 22°C no experimentaron variaciones notables con respecto a los niveles alcanzados durante el enfriamiento (Figura 22).

IV.2.5 PICO 5

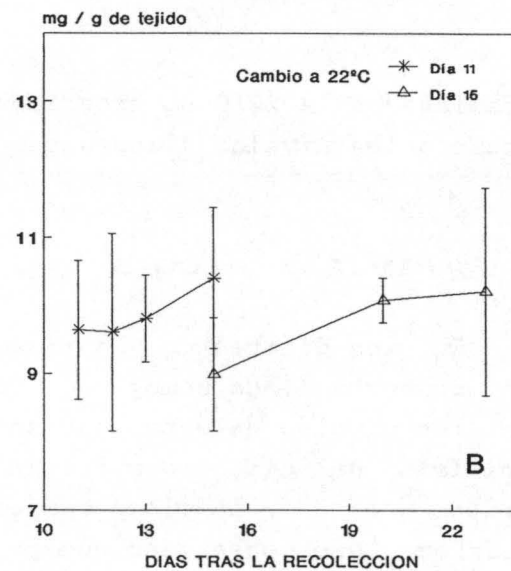
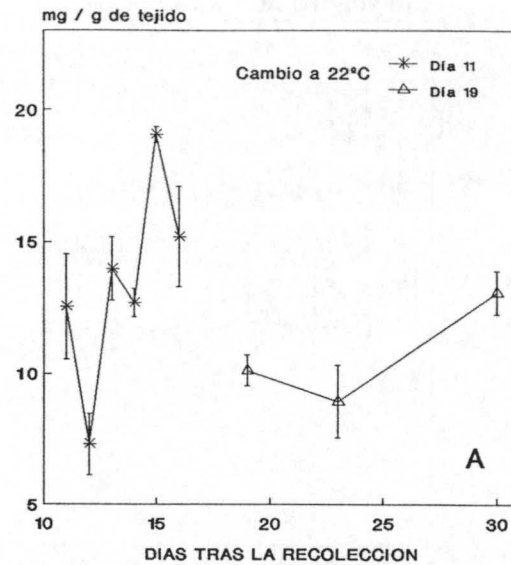
En los diferentes experimentos realizados, no hemos encontrado un comportamiento homogéneo que nos permita explicar la evolución en los niveles de esta sustancia a lo largo de la maduración. Los análisis del día cero muestran una gran variabilidad de un lote de frutos a otro de la misma temporada y procedentes de la misma zona. Asimismo hemos observado que para una misma temperatura y periodo de maduración, el pico puede ser detectado en unos frutos y estar ausente en otros. No obstante, debido a los niveles encontrados en algunos estadios de la maduración nos pareció importante evaluar su contenido en diferentes experimentos. Además su identificación como un derivado del inositol indica que esta sustancia pueda tener una gran importancia en el control de la maduración del fruto.

En la Tabla VII se expresan los resultados encontrados en tres experimentos diferentes y de forma gráfica en la Figura 23.

Como puede observarse los resultados presentan una gran variabilidad de unos frutos a otros dentro del mismo experimento y sobre todo entre experimentos diferentes.

Si, como parece probable, se tratara de un azúcar con propiedades reguladoras, esta variabilidad sería explicable debido a la heterogeneidad de las muestras experimentales. Aunque siempre se tenía un cuidado muy especial en la selección de los frutos, procurando que éstos se encontraran

FIGURA 22.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en pino 1, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).

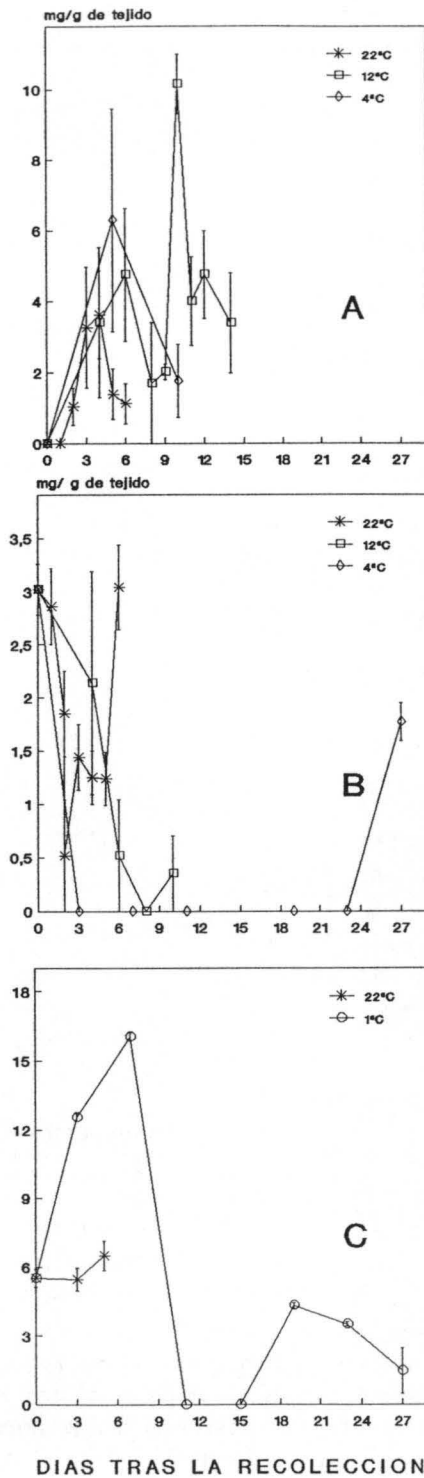


en el estado óptimo de madurez fisiológica, después del engrosamiento causado por acúmulo de agua que tiene como consecuencia el estiramiento de los carpelos y un cambio en la tonalidad del color verde del epicarpio, es factible que esto no se consiguiera siempre con la precisión deseada.

TABLA VII.- Concentración del pico 5 en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	0	0	0	
1	0			
2	1'05±0'52			
3	3'27±1'71			
4	3'63±1'24	3'41±2'12		
5	1'39±0'71		6'31±3'15	
6	1'13±0'57	4'76±1'87		
8		1'70±1'70		
9		2'02±0'21***		
10		10'17±0'85***	1'76±1'03	
11		4'01±1'25*		
12		4'76±1'25*		
14		3'39±1'40		
0	3'02±0'24	3'02±0'36	3'02±0'36	
1	2'86±0'36			
2	1'85±0'40	0'52±0'52		
3	1'44±0'31			
4	1'25±0'25	2'14±1'05		
5	1'24±0'43			
6	3'04±0'40	0'52±0'52		
7			0	
8		0		
10		0'35±0'35		
11			0	
15			0	
19			0	
23			0	
27			1'77±0'18	
0	5'51±1'12			5'51±0'40
3	5'45±0'51			12'55±0'16***
5	6'50±0'64			
7				16'04±0'16***
11				0
15				0
19				4'29±0'12*
23				3'49±0'10**
27				1'46±0'99**

Los resultados están expresados en mg de azúcar por gramo de tejido, tomando como patrón el índice de refracción de la glucosa, y son la media \pm S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado, en tres experimentos diferentes. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * $p < 0'05$, ** $p < 0'01$, *** $p < 0'001$ respecto a los valores iniciales.



Este azúcar puede sufrir modificaciones en su concentración cuando el fruto está aún en el árbol, lo que explicaría las diferencias en los valores iniciales. Estos cambios pueden estar relacionados con la maduración del fruto en el árbol y responder a variaciones climatológicas y/o estacionales.

Por los resultados obtenidos no se puede establecer un patrón de la evolución del fruto durante la maduración postcosecha, aunque sí parece que en la mayoría de los experimentos hay un momento en que su concentración se ve incrementada para posteriormente disminuir.

FIGURA 23.- Evolución del contenido en pisco 5, expresado en mg/g de tejido húmedo (tomando como patrón el índice de refracción de la glucosa), en el mesocarpio de frutos conservados a diferentes temperaturas. En cada panel se muestran los resultados de un experimento diferente.

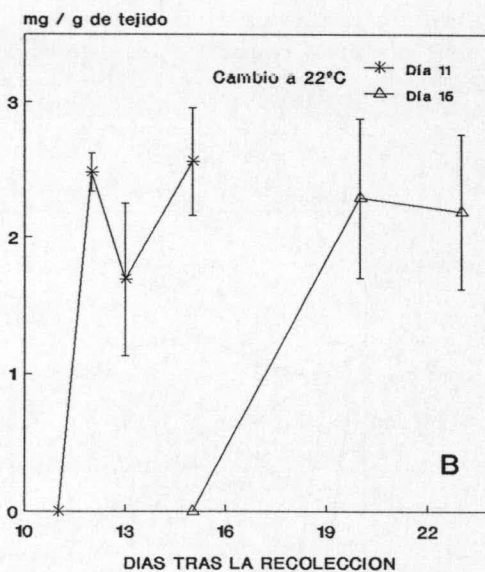
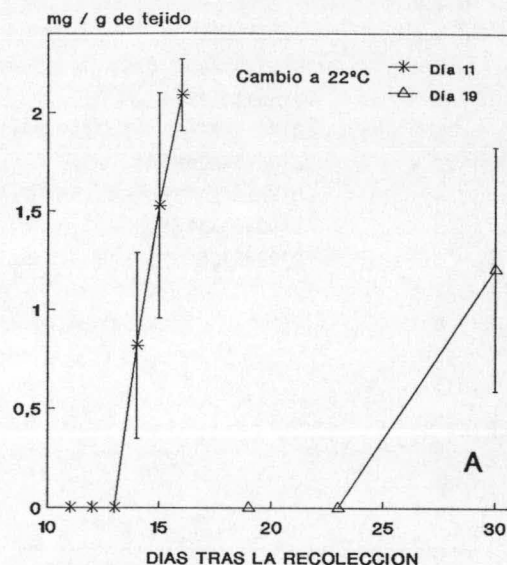
IV.2.6 ALMIDON.

En frutos climátericos el almidón suele acumularse progresivamente durante el crecimiento y no experimenta cambios degradativos hasta que tiene lugar la maduración. La evolución de los

niveles de almidón en el mesocarpio de chirimoya durante la maduración a diferentes temperaturas queda reflejada en la Tabla VIII.

Como podemos observar, cuando la maduración tiene lugar a 22°C el contenido en almidón disminuye bruscamente de manera que el cuarto día tras la recolección prácticamente todo el almidón se encuentra hidrolizado, coincidiendo este descenso con el incremento que experimenta la concentración de monosacáridos y otros sólidos solubles. Al producirse la maduración a 12°C la velocidad de hidrólisis es algo más lenta, pero también su disminución coincide con la elevación que a esta temperatura experimentan los niveles de

FIGURA 24.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en pisco 5, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B). Resultados de un experimento con seis frutos por condición.



glucosa, fructosa y otros sólidos solubles. Sin embargo cuando la maduración tiene lugar a 4°C o a 1°C, la degradación del almidón además de enlentecerse no llega a ser total.

En la figura 25, podemos ver cómo durante la maduración a 22°C y a 12°C el almidón se hidroliza en su totalidad. A 4°C, 27 días

TABLA VIII.- Concentración de almidón en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	115'55±9'24	115'55±9'24	115'55±9'24	115'55±9'24
1	99'53±11'15			
2	60'98±5'77***	119'09±11'54		
3	28'06±5'20***		108'39±11'80	106'32±8'92
4	0'77±0'39***	56'07±7'87***		
5	0'99±0'33***			
6	0'59±0'08***	17'35±3'39***		
7			92'96±13'28	112'70±13'27
8		4'70±2'02***		
10		3'41±0'65***		
11			87'36±11'51	121'04±7'53
15			64'25±15'72*	116'27±18'61
19			56'62±10'68**	106'98±16'13
23			25'87±5'76***	91'38±14'14
27				81'78±7'71*

Los resultados están expresados en mg de almidón por gramo de tejido y son la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * p < 0'05, ** p < 0'01, *** p < 0'001 respecto a los valores iniciales.

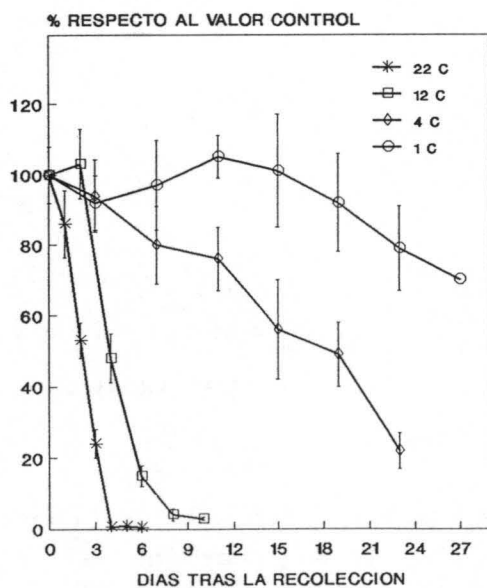
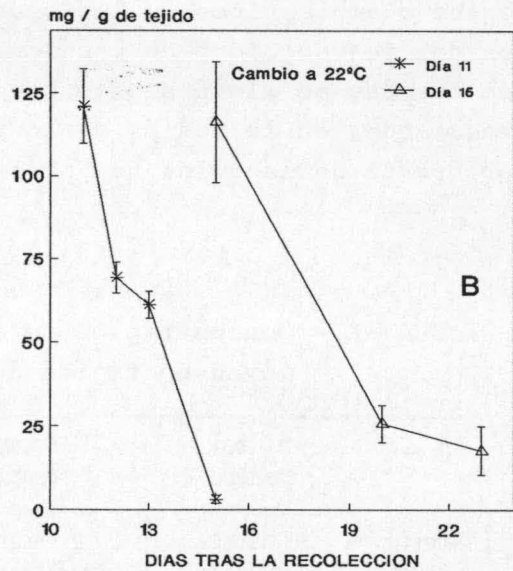
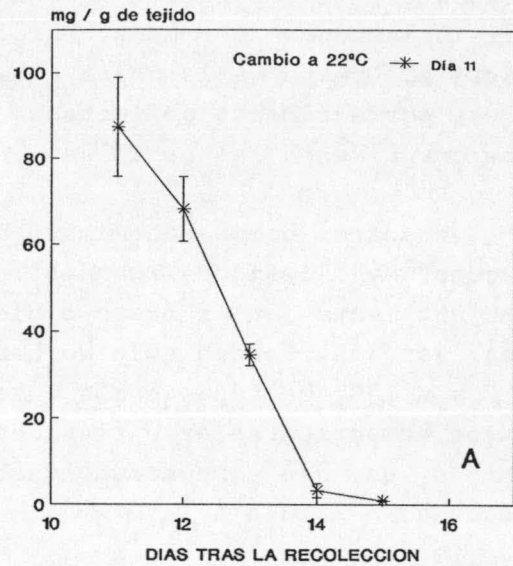


FIGURA 25.- Evolución porcentual, respecto al valor inicial, del contenido en almidón, en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

después de la recolección, el 22% del almidón no ha sufrido hidrólisis y si la maduración se produce a 1°C, para este mismo periodo de tiempo, el 80% del almidón se encuentra intacto en el fruto.

Si los frutos conservados a 4°C y a 1°C, el día 11 tras la recolección se trasladan a 22°C, observamos que la capacidad de hidrólisis por parte de la α -amilasa no se ha alterado y el almidón se degrada rápidamente, de forma que el quinto día de madurar a 22°C se ha hidrolizado totalmente. No obstante, cuando la conservación de los frutos a bajas temperaturas es más prolongada y el paso a 22°C no se realiza el día 15 después de haber sido

FIGURA 26.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas del contenido en almidón, cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B).



recolectados, la degradación tiene lugar, pero no es total y encontramos que tras madurar 7 días a 22°C el contenido en almidón es todavía del 15% (Figura 26).

IV.2.7. DETERMINACION DE AZUCARES EN TEJIDOS LESIONADOS

Los daños por frío, entre otras manifestaciones, producen en el mesocarpio la aparición de zonas pardas difusas, que pueden contener inclusiones de granos negros muy pequeños y de dureza muy superior al resto de la pulpa ennegrecida. En el endocarpio aparecen zonas perfectamente delimitadas a modo de vesículas de color rosado que envuelven a las semillas.

Nosotros hemos denominado a estas zonas dañadas como "lesiones pardas" y "lesiones rosadas". Estas lesiones pueden manifestarse conjuntamente en el fruto o bien estar presente sólo una de ellas. Las lesiones rosadas sólo se han encontrado en frutos almacenados a 4°C y a 1°C, haciéndose más intensas cuando los frutos conservados a bajas temperaturas eran trasladados a 22°C. Sin embargo las lesiones pardas se han encontrado también en frutos senescentes que han madurado a 22°C o a 12°C.

En algunos de los frutos dañados por frío, que presentaban alguno o ambos tipos de lesiones, se realizaron extractos metanólicos del mesocarpio y de las zonas dañadas. En el caso de las lesiones rosadas se llevó a cabo una minuciosa disección de las vesículas procurando, en la medida de lo posible, que no hubiese contaminación por parte de la pulpa que presentaba aspecto normal. Las lesiones

TABLA IX.- Concentración de azúcares en mesocarpio de chirimoyas en tejido dañado y en tejido normal.

	TEJIDO CONTROL	LESIONES ROSADAS	TEJIDO CONTROL	LESIONES PARDAS
PICO-1	9'71±0'45	7'96±0'66	9'49±1'19	8'60±1'01
SACAROSA	14'23±1'71	13'18±1'69	15'46±2'12	12'54±1'70
GLUCOSA	33'85±5'20	35'78±7'32	47'69±4'76	51'87±4'26
FRUCTOSA	37'48±5'00	35'85±7'01	46'71±7'14	50'34±10'21
PICO-5	2'52±0'15	3'16±0'14	3'19±0'26	3'09±0'21

Los resultados están expresados en mg de azúcar por gramo de tejido, tomando como patrón el índice de refracción de la glucosa como patrón para los picos 1 y 5. Son la media ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * p < 0'05, ** p < 0'01, *** p < 0'001 respecto a los valores controles.

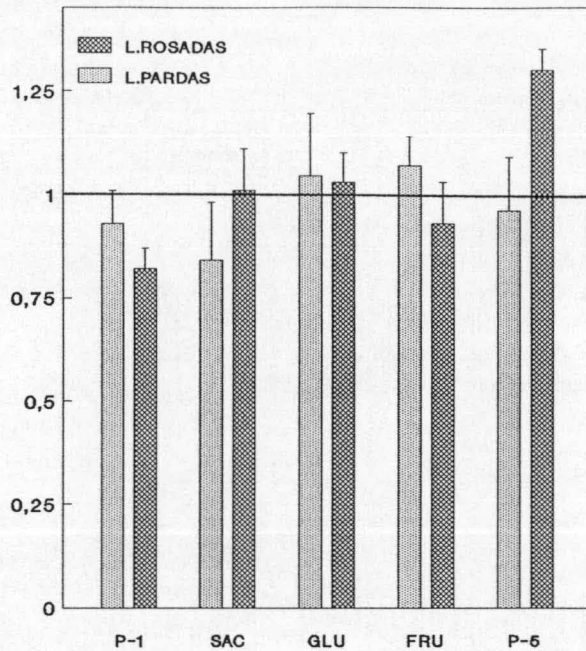
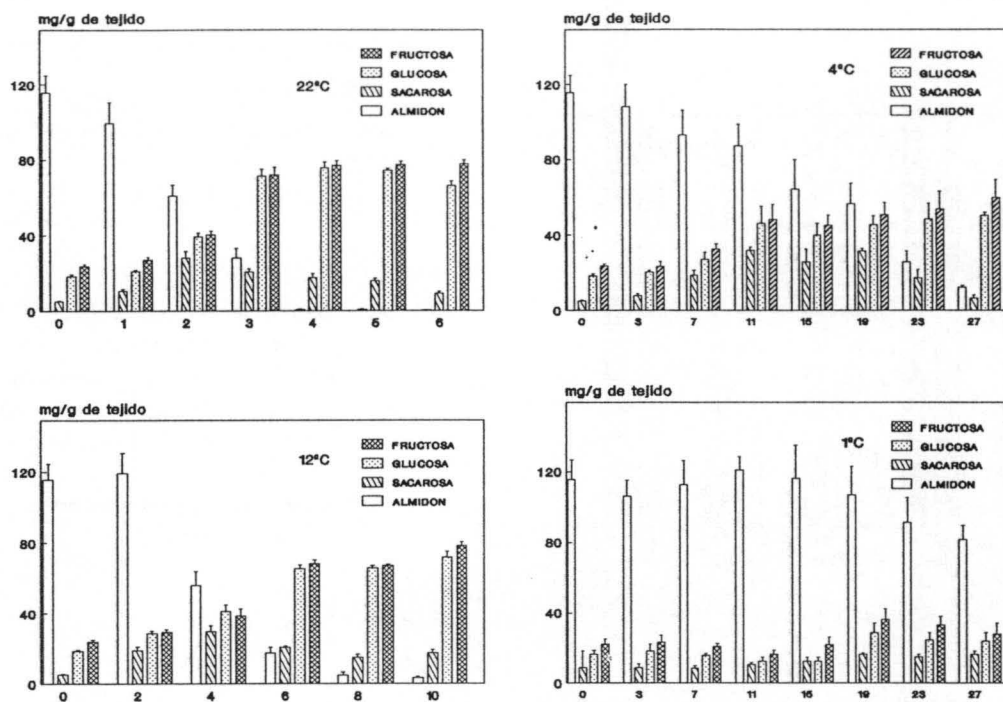


FIGURA 27.- Concentración de azúcares en tejidos lesionados de mesocarpio de chirimoya, respecto a la concentración en tejidos aparentemente no dañados. La línea horizontal representa el valor de cada uno de los azúcares en tejido control.

pardas al ser zonas menos localizadas iban necesariamente más contaminadas de pulpa con apariencia normal.

En estos extractos metanólicos se llevó a cabo la determinación de azúcares. En la Tabla IX quedan reflejados los valores obtenidos para los diferentes azúcares en el tejido control, mesocarpio blanco aparentemente no lesionado, y en los tejidos lesionados procedentes del mismo fruto.

Normalizando los valores de concentración, de los azúcares medidos en los extractos procedentes del tejido dañado, con los obtenidos en el mesocarpio de apariencia normal, obtenemos que no se producen importantes diferencias, a excepción del pico 5 que muestra un incremento apreciable en las lesiones rosadas (Figura 27).

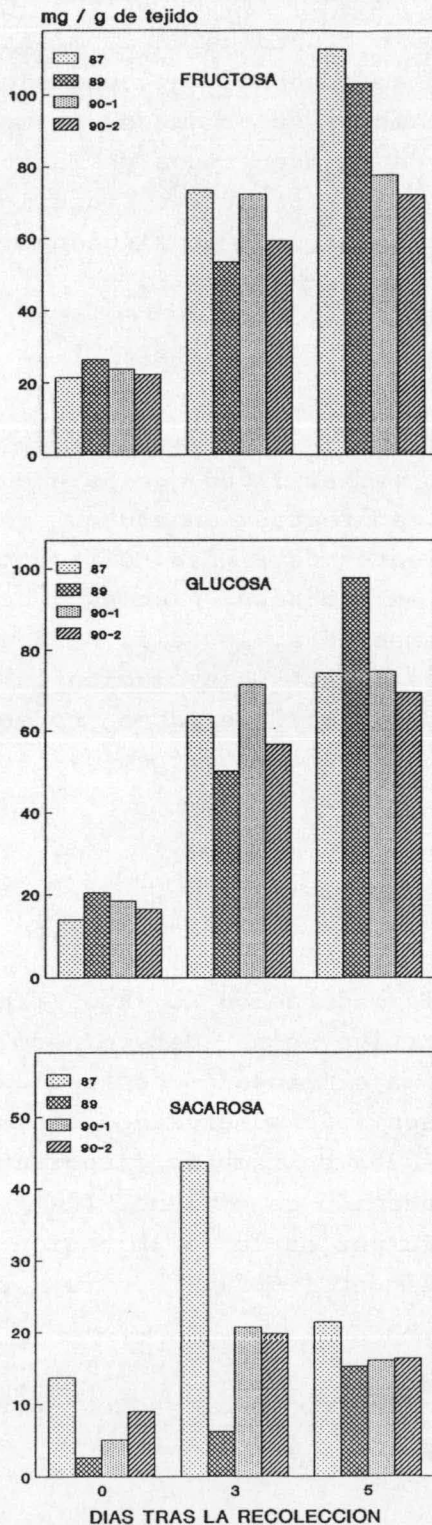


- DIAS TRAS LA RECOLECCION -

FIGURA 28.- Evolución en el contenido de los azúcares mayoritarios en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

IV.2.8. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EVOLUCION DEL CONTENIDO EN AZUCARES DURANTE LA MADURACION

Cabe ahora realizar un pequeño estudio comparativo de la evolución de los contenidos en azúcares mayoritarios, encontrados en el mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas a lo largo de la maduración.



El polisacárido de reserva en los frutos del chirimoyo, como en todos los vegetales superiores, es el almidón. Entre los disacáridos es relativamente abundante la sacarosa y no existe maltosa en cantidades detectables, mientras que los monosacáridos que se encuentran en mayor concentración son la glucosa y la fructosa.

El metabolismo glucídico se ve fuertemente afectado durante la maduración. Durante sus primeras etapas, una vez que el fruto ha sido recolectado, comienza una activa amilolisis que es anterior al inicio en la producción masiva de etileno, hasta que el almidón se hace indetectable. Coincidente con la amilolisis se produce un incremento en la concentración de sacarosa y, también, en los contenidos de fructosa y de glucosa. La sacarosa alcanza un máximo que suele ocurrir en coincidencia con la aparición del pico de etileno, pasando a ser hidrolizada posteriormente. Esto produce un aumento todavía mayor en las concentraciones de glucosa y de fructosa.

FIGURA 29.- Concentración de los azúcares mayoritarios encontrados en mesocarpio de chirimoyas en frutos recolectados en diferentes temporadas y en diferentes estadios de maduración a 22°C.

En términos generales, la glucosa incrementa su concentración en un 400% cuando el chirimoyo madura, mientras que la fructosa lo hace en torno a un 300%.

La temperatura de almacenamiento de los frutos tiene gran importancia en la evolución del metabolismo glucídico. Así, mientras que el comportamiento a 12°C es idéntico al observado en condiciones controles, con la salvedad de que los cambios se producen a menor velocidad, a 4°C la concentración final de monosacáridos es inferior a la alcanzada en condiciones controles. A temperaturas inferiores de conservación nunca se degrada el almidón ni, por consiguiente, se incrementa el contenido en monosacáridos.

Todos estos cambios están recogidos en forma gráfica en la Figura 28.

Por último, hay que reseñar la gran variabilidad que se encuentra de unos frutos a otros, ampliamente manifestada en frutos recolectados en distinta temporada o provenientes de fincas diferentes. En la Figura 29 se muestra el contenido en fructosa, glucosa y sacarosa de frutos recogidos en distintas temporadas, los días 0, 3 y 5 tras la recolección. Puede observarse que aunque la evolución en los contenidos de los azúcares sigue el mismo perfil, existen notables diferencias en el contenido de cada uno de los azúcares, y sobre todo en la proporción relativa entre los mismos.

IV.3 DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

El metabolismo oxidativo durante la maduración de los frutos tiene una gran importancia. Por este motivo se ha determinado la actividad de tres enzimas implicados en la eliminación de radicales libres como son la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa. La determinación de actividad peroxidasa es también importante, ya que puede estar implicada en la producción de etileno (Kang et al., 1971) y tiene capacidad para participar en la eliminación de ácido indol-3-acético (Siegel y Galston, 1967), entre otras posibilidades.

Las actividades enzimáticas, se han medido en extractos crudos preparados según se ha descrito en el apartado III.2.3.2.

IV.3.1. CATALASA

Los datos obtenidos para la actividad catalasa, en diferentes curvas de maduración, quedan reflejados en la Tabla X.

Se puede observar que la actividad catalasa disminuye durante la maduración a cualquier temperatura, aunque el descenso que experimenta no es tan acentuado cuando los frutos se conservaban a bajas temperaturas. En este caso vuelve a ser patente la gran heterogeneidad del material de partida. Frutos que fueron ensayados lo antes posible tras la recolección (tres a cinco horas) presentaban valores claramente distintos (306'48 y 136'18) en los dos experimentos seleccionados. No obstante, el comportamiento durante la conservación es siempre similar.

TABLA X.- Actividad catalasa en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	EXP. 1			EXP. 2	
	22°C	12°C	4°C	22°C	1°C
0	306'48±30'53	306'48±30'53	306'48±30'53	136'18± 4'89	136'18± 4'89
1	173'74±13'47				
2	225'89±12'93	134'95± 4'98**			
3	116'37±13'34**		110'49± 7'64**	75'38± 3'16**	150'86±15'27
4	34'64± 4'46**	120'31±10'09**			
5	23'09± 5'22**			45'44± 3'03**	
6	28'42± 2'71**	78'80± 5'35**			
7			122'89± 4'52**		118'66±16'97
8		65'01± 4'15**			
10		38'70± 5'31**			
11			118'07±11'98**		123'03±12'27
15			146'82± 6'20*		86'08± 8'93**
19			126'25±10'93*		
23			113'82±11'92**		57'95± 3'37**
27			95'82± 4'36**		95'87±10'30*

Los resultados están expresados en $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{P}$ y son la media \pm S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado, correspondientes a dos experimentos diferentes. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * $p < 0'01$, ** $p < 0'001$ respecto a los valores iniciales.

En la Figura 30 hacemos referencia al porcentaje de actividad a lo largo de la maduración. Observamos que tanto a 22°C como a 12°C, la actividad va disminuyendo hasta conservar tan sólo un 10% del

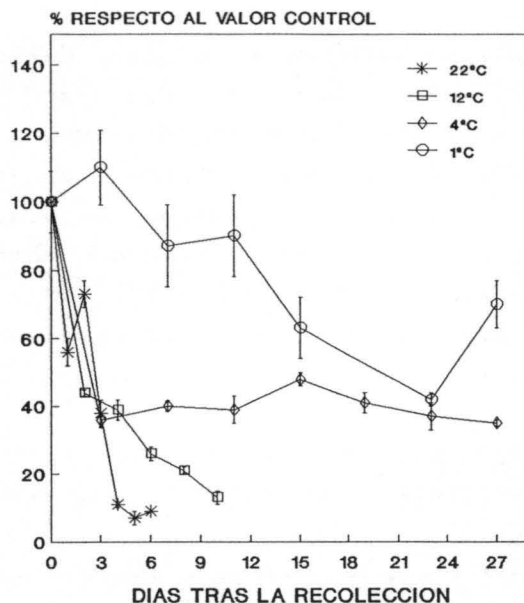


FIGURA 30.- Actividad catalasa en extractos acuosos de mesocarpio de chirimoyas, conservadas a diferentes temperaturas. Los resultados están expresados como porcentaje de los valores iniciales.

valor inicial cuando el fruto está maduro, mientras que cuando los frutos son sometidos a una conservación a bajas temperaturas, la disminución en la actividad es mucho menor y así podemos ver que tras 27 días a 4°C aún se conserva el 35% y si la maduración tiene lugar a 1°C la actividad catalasa encontrada en los frutos es del 70% del valor obtenido con frutos recién recolectados.

Se comprobó que la congelación-descongelación del tejido producía un descenso en la actividad ensayable del enzima próximo al 35%. Sin embargo, una vez realizado el extracto, éste se podía mantener hasta 15 días en el frigorífico, a 4°C o congelado, sin que se produjera pérdida de actividad durante dos semanas.

La conservación de los frutos a 4°C o a 1°C, durante periodos variables de tiempo, no afectaba a la pérdida de actividad que siempre se producía cuando los frutos se almacenaban a 22°C, aunque no llegaban a alcanzarse los mínimos detectados para los frutos madurados a 22°C durante todo el tiempo (Figura 31).

FIGURA 31.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas de la actividad catalasa cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B) durante diferentes periodos de tiempo.

IV.3.2 PEROXIDASA

Los valores medidos para la actividad peroxidasa, en diferentes curvas de maduración, quedan reflejados en la Tabla XI.

Al igual que en otros tipos de frutos, durante la maduración post-cosecha de las chirimoyas se produce un incremento en la actividad ensayable de la peroxidasa. Tanto en las curvas de maduración a 22°C como a 12°C, este resultado es evidente, sin embargo, las lesiones producidas en los frutos cuando éstos se almacenan a 4°C o a 1°C, impiden el incremento en la actividad peroxidasa (Figura 32).

Este efecto es claramente dependiente de la temperatura de almacenaje, así como de la duración del periodo de conservación en frío. Los frutos mantenidos a 4°C durante 11 días, aún conservan la capacidad de síntesis de nuevo enzima y cuando se trasladan a 22°C se produce un incremento en la actividad del mismo. No sucede así cuando se mantienen a esta temperatura durante periodos mayores de tiempo, o cuando la conservación se ha realizado a 1°C (Figura 33).

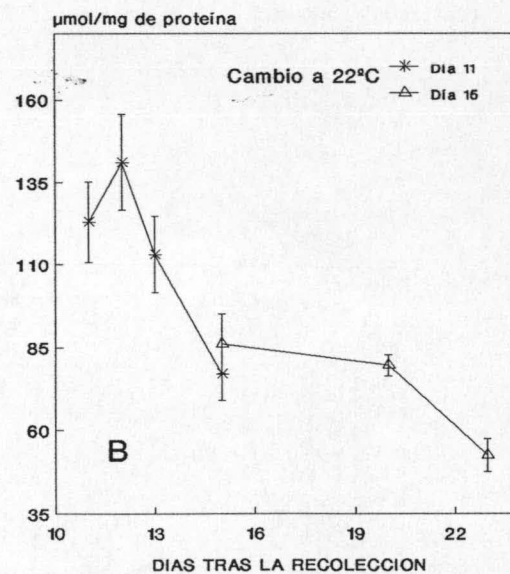
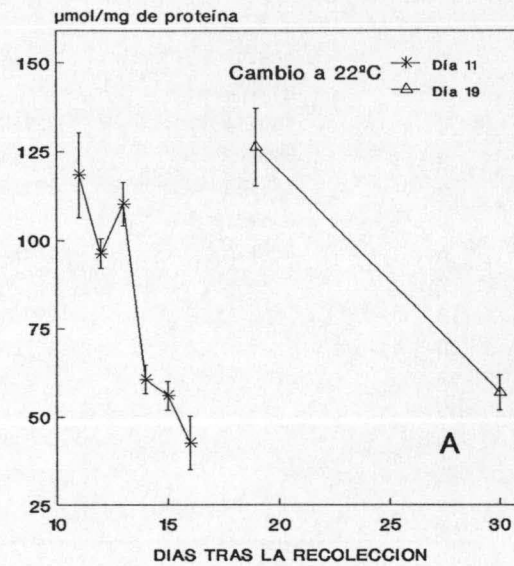


TABLA XI.- Actividad peroxidasa en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

D.T.R.	22°C	12°C	4°C	1°C
0	203±57	203±57	203±57	215±40
1	214±64			
2	109±34	225±32		
3	398±79		307±83	164±40
4	375±86	283±56		
5	213±25			
6	427±16	342±70		
7			176±37	217±27
8		299±16		
10		407±43		
11			221±50	119±19
15			248±85	161±9
19			219±55	148±44
23			339±112	70±10
27				169±28

Los resultados están expresados en $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{P}$ y son la media \pm S.E.M. de seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza.

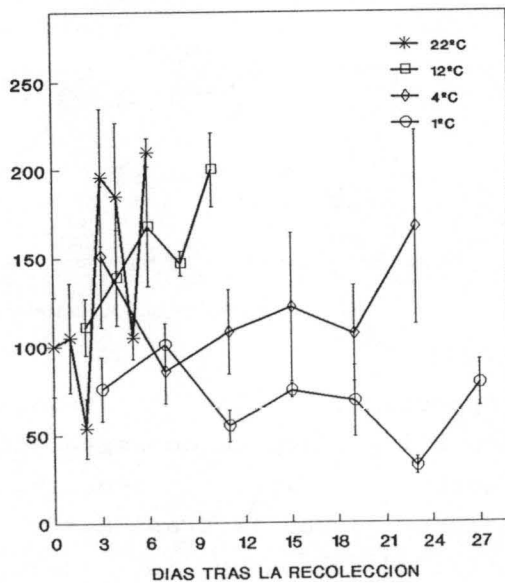


FIGURA 32.- Evolución porcentual, respecto al valor inicial, de la actividad peroxidasa en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas.

Al igual que hicimos para la actividad catalasa, se comprobó la estabilidad del enzima en los extractos y el efecto de la congelación del tejido de los frutos. Existe una pérdida de actividad próxima al 80% cuando el enzima se extrae de tejidos congelados, por lo que siempre hay que operar con fruta fresca. Una vez realizados los extractos, éstos no pierden apreciablemente actividad durante dos semanas, si se conservan a 4°C.

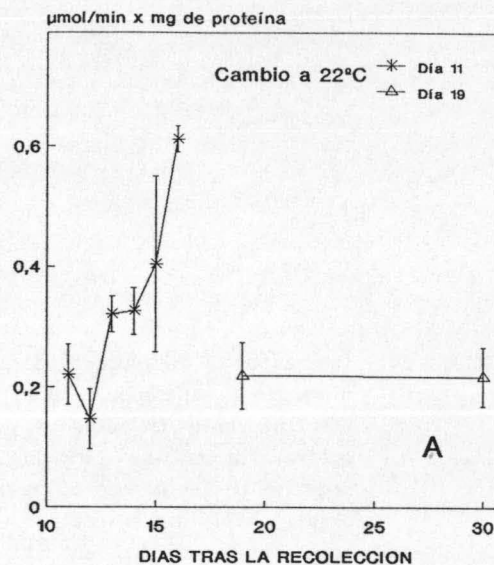
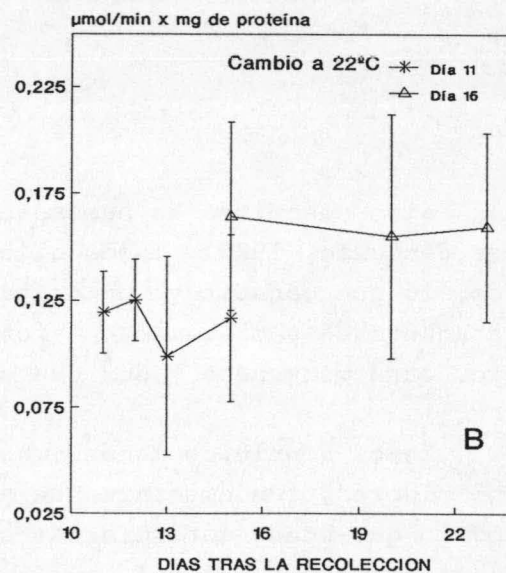


FIGURA 33.- Evolución en mesocarpio de chirimoyas de la actividad peroxidasa cuando los frutos maduraban a 22°C, tras haber sido conservados a 4°C (A) o a 1°C (B) durante diferentes periodos de tiempo.

IV.3.3 SUPEROXIDO DISMUTASA

Este enzima está ampliamente distribuido en el Reino vegetal. Su claro papel de protección frente a los radicales libres nos indujo a estudiar su evolución durante la maduración del fruto del chirimoyo a diferentes temperaturas, para estudiar la posible existencia de cambios adaptativos como consecuencia de la conservación en frío de los frutos.



El enzima presenta diferentes formas isoenzimáticas en distintos tejidos o compartimentos intracelulares del mismo tejido, que

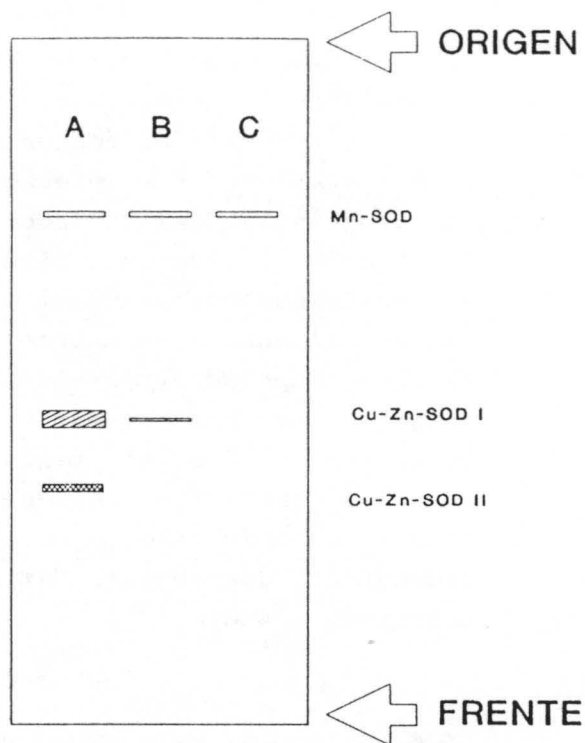


FIGURA 34.- Isoenzimas de la superóxido dismutasa separados por electroforesis en geles de poliacrilamida. La tinción negativa de las bandas donde existía actividad se realizó como está indicado en el apartado III.2.6.1.1. A) Sin inhibidores. B) Peróxido de Hidrógeno 2mM. C) Cianuro potásico 1mM.

han sido descritos en numerosos trabajos (para una amplia revisión ver Sandalio, 1989). Todos ellos tienen uno o varios átomos metálicos, lo que constituye un criterio para su clasificación. Así están caracterizadas claramente 4 formas del enzima, una conteniendo hierro, otra manganeso y dos que contienen cobre y zinc.

Estos distintos isoenzimas responden diferencialmente a varios inhibidores, fundamentalmente al cianuro y al peróxido de hidrógeno, por lo que puede determinarse su actividad como ha sido descrito en el apartado III.2.6.1.1.

El método empleado para determinar la actividad de este enzima es un método competitivo, basado en la reducción del citocromo c por los radicales superóxidos originados por la xantina oxidasa, y la eliminación de los mismos por la actividad superóxido dismutasa del extracto. Al no ser un método directo de medida, se pueden presentar muchas interferencias inespecíficas, como pudimos comprobar, cuando la determinación se realiza en extractos crudos.

El mayor problema fue el de la determinación de la actividad en extractos previamente incubados en presencia de H_2O_2 2mM, durante 30 min para inactivar a las Cu-Zn-SOD y Fe-SOD. Este tratamiento debe dar directamente la actividad Mn-SOD que es la que no se debe inactivar. La determinación de actividad en presencia de cianuro 1mM debe ser la suma de las actividades Mn-SOD y Fe-SOD.

Generalmente con extractos de mesocarpio de chirimoyo obteníamos una actividad diez veces superior en presencia de H_2O_2 que la determinada con cianuro, lo que no puede ocurrir ya que con cianuro debemos medir la suma de las actividades Mn-SOD y Fe-SOD, mientras que en presencia de H_2O_2 deberíamos determinar únicamente la actividad Mn-SOD.

Procedimos a la separación de las proteínas del extracto en geles de poliacrilamida al 10% y a su posterior tinción negativa con nitroazul de tetrazolium, en ausencia de inhibidores, así como en presencia de H_2O_2 2mM o de cianuro 1mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34.

TABLA XII.- Actividad superóxido dismutasa en mesocarpio de chirimoyas conservadas a diferentes temperaturas.

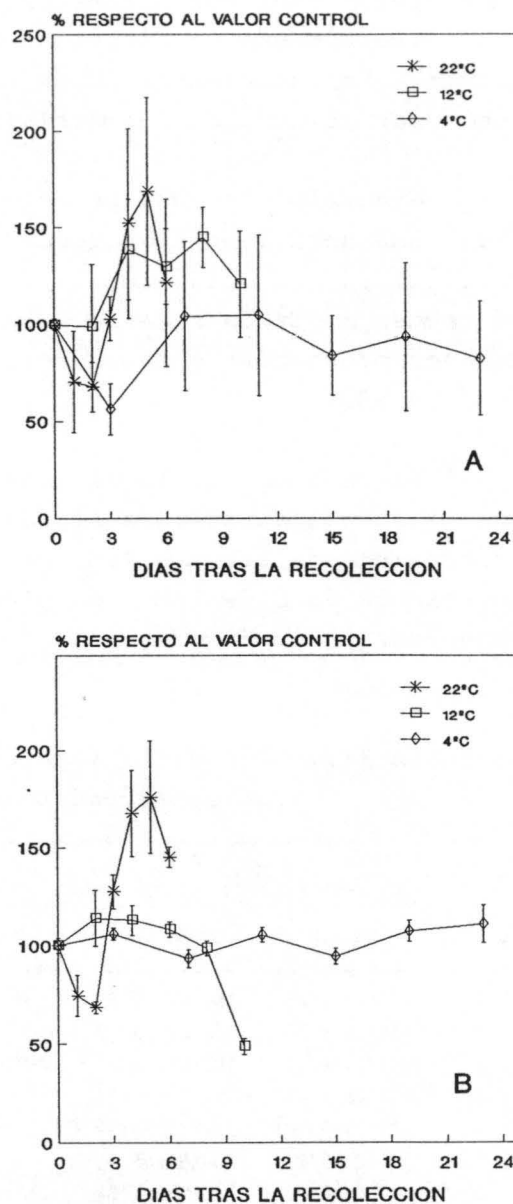
D.T.R.	22°C		12°C		4°C	
	Mn-SOD	Cu-Zn-SOD	Mn-SOD	Cu-Zn-SOD	Mn-SOD	Cu-Zn-SOD
0	20'29±6'23	150'65± 5'81				
1	14'26±5'30	112'29±15'78				
2	13'71±2'61	103'44± 4'67	20'04±6'54	171'75±21'47		
3	20'88±2'29	192'12±13'14			11'38±2'68	159'36± 4'54
4	30'91±9'98	252'15±33'54	28'15±5'28	169'84±11'46		
5	34'25±9'86	264'86±43'66				
6	24'60±8'80	218'55± 7'84	26'36±4'00	161'97± 5'91		
7					21'16±7'81	140'63± 6'95
8			29'43±3'14	148'11± 5'83		
10			24'50±5'57	73'24± 6'18		
11					21'25±8'43	158'42± 5'86
15					17'02±4'15	142'05± 6'11
19					18'97±7'76	161'24± 8'08
23					16'76±5'95	166'70±14'65

Los resultados están expresados en Unidades $\times mg^{-1}$ P y son la media \pm S.E.M. de seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza.

La ausencia de Fe-SOD nos garantizaba que los resultados previos obtenidos en presencia de H_2O_2 , eran consecuencia de una reducción no controlada del citocromo c, debida posiblemente a algún contaminante de los extractos, que protegía de la inhibición por agua oxigenada a las Cu-Zn-SOD. Por otra parte, las formas isoenzimáticas más abundantes y con mayor actividad, como se evidenciaba en los geles de poliacrilamida. En alguno de estos geles pudimos comprobar que la incubación con H_2O_2 1mM no bastaba, en ocasiones, para la inhibición completa de estos isoenzimas.

Ante la ausencia de Fe-SOD pudimos prescindir de la incubación con peróxido de hidrógeno, de forma que los resultados

FIGURA 35.- Actividad porcentual, respecto a los valores iniciales, de los isoenzimas de la Superóxido dismutasa estudiados en mesocarpio de chirimoya, durante la maduración a diferentes temperaturas. A) Mn-SOD. B) Cu-Zn-SOD.



están calculados considerando que la actividad Mn-SOD corresponde a la determinada en presencia de cianuro y, por tanto, la suma de las actividades de los isoenzimas I y II de la Cu-Zn-SOD es igual a la actividad total menos la determinada en presencia de cianuro. Los resultados de estas actividades durante la maduración de los frutos a diferentes temperaturas se muestran en la tabla XII.

Los dos isoenzimas presentan una evolución paralela en sus actividades. En la maduración a 22°C se presenta un pequeño mínimo, para evolucionar posteriormente hasta un valor del 175%, coincidente con el pico de etileno. A 12°C el perfil es semejante para la Mn-SOD, mientras que la Cu-Zn-SOD se mantiene estable hasta el día 8 tras la recolección. Cuando los frutos se conservan a 4°C, los enzimas no evolucionan, permaneciendo sus niveles durante los 23 días del experimento muy semejantes a los encontrados el primer día tras la recolección (Figura 35).

Cuando los frutos almacenados a 4°C durante nueve días se colocaban en una habitación a 22°C, no se observaron cambios en la actividad de ninguno de los isoenzimas hasta el día 15, fecha en que concluyó este experimento.

IV.4 DETERMINACION DE LIPIDOS EN MESOCARPIO DE CHIRIMOYA.

Durante la maduración de los frutos se producen una serie de cambios metabólicos, en los que deben estar implicadas numerosas alteraciones en la permeabilidad de las membranas de diferentes orgánulos, lisosomas, peroxisomas etc., que liberarán una variedad de enzimas líticos, que a buen seguro, participarán en los procesos degradativos típicos de la maduración y senescencia. Los fenómenos de adaptación al frío deben, igualmente, implicar diferentes procesos de remodelación de lípidos, con la finalidad de mantener a las membranas en el estado óptimo de permeabilidad.

Por estos motivos nos planteamos realizar un estudio del contenido lipídico del mesocarpio de chirimoyas almacenadas a diferentes temperaturas, en distintos estadios de maduración.

Se ha realizado, en primer lugar, un estudio de los ácidos grasos constituyentes del total de los lípidos extraídos del mesocarpio, según el método de Folch (1957). También se han separado dos fracciones características en una cromatografía en capa fina (TLC): la fracción de fosfolípidos y la correspondiente a los ácidos grasos libres, que del mismo modo se han estudiado a lo largo de la maduración.

En segundo lugar se han separado y estudiado en frutos verdes

controles, maduros y lesionados por almacenamiento a bajas temperaturas todas las fracciones lipídicas obtenidas por TLC desarrolladas en dos fases móviles diferentes.

IV.4.1. EVOLUCION DEL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS DURANTE LA MADURACION A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Se han seleccionado tres temperaturas de almacenamiento, 22°C que corresponde a una temperatura de maduración fisiológica, 12°C que sería una temperatura de conservación que no debe producir daños por frío y, por último, 4°C, temperatura a la que algunas alteraciones en la maduración resultan aparentes. Dentro de cada temperatura se han seleccionado varios días para realizar este estudio. Así, se han escogido aquellos días que coinciden con la iniciación del climaterio, entendido por tal el comienzo de la producción masiva de etileno, y los días que corresponden al final de la senescencia. A 22°C estas etapas corresponden con los días 3 y 6 tras la recolección, mientras que a 12°C lo hacen, aproximadamente, con los días 6 y 10. A 4°C, dado que no se produce una respuesta típica en la producción de etileno, se han seleccionado los días 11, 19 y 23.

Como se indicó en la correspondiente sección de métodos, se han identificado veinte ácidos grasos componentes de este tejido. A todas las temperaturas y en todos los estados de maduración la composición relativa de los ácidos grasos nos ha permitido clasificarlos en tres grupos: mayoritarios, minoritarios y escasos.

Acidos grasos mayoritarios: C16, C18, C18:1, C18:2W6 y C18:3W3.

Acidos grasos minoritarios: C16:1, C17, C17:1, C18:3w6, C20, C22, C22:6w3 y C24:1

Acidos grasos escasos: C18:4w3, C20:1, C20:3w6, C20:4w6, C20:5w3, C22:3w6 y C22:4w6.

Además de éstos, en algunas muestras aisladas aparecía algún pico, normalmente muy escaso, que no ha podido ser identificado, y por lo tanto se ha prescindido de él para su análisis.

IV.4.1.1. LIPIDOS TOTALES

El estudio se ha efectuado en extractos realizados con cloroformo:metanol, tal como se ha descrito en la correspondiente sección de métodos. Los lípidos extraídos se han saponificado y metilado, realizándose la determinación del contenido de ácidos grasos totales por cromatografía de gases. Los resultados en la composición porcentual de los veinte ácidos grasos estudiados en frutos madurados a 22°C, 12°C y 4°C están expresados en las tablas XIII, XIV y XV.

TABLA XIII.- Evolución del contenido en ácidos grasos de lípidos totales en mesocarpio de chirimoyas maduradas a 22°C.

Ac. GRASO	0 D.T.R.	3 D.T.R.	6 D.T.R.
16	26'91 ± 3'89	32'02 ± 4'63	25'69 ± 2'64
16:1	2'19 ± 1'43	3'53 ± 1'11	3'25 ± 1'00
17	2'04 ± 0'54	3'67 ± 1'41	2'76 ± 0'50
17:1	2'13 ± 1'01	4'17 ± 1'33	4'65 ± 1'13
18	4'33 ± 1'29	5'86 ± 1'19	6'44 ± 0'77
18:1	8'59 ± 2'80	8'80 ± 2'19	10'05 ± 1'32
18:2N6	27'21 ± 3'45	18'87 ± 1'72*	17'01 ± 1'88*
18:3N6	1'66 ± 1'01	0'70 ± 0'48	1'31 ± 0'32
18:3N3	17'75 ± 1'67	14'69 ± 1'70	17'00 ± 1'77
18:4N3	0'45 ± 0'26	0'57 ± 0'51	0'56 ± 0'16
20	1'36 ± 0'41	0'96 ± 0'38	1'46 ± 0'36
20:1	0'35 ± 0'12	0'74 ± 0'41	0'31 ± 0'11
20:3N6	0'13 ± 0'06	0'12 ± 0'02	0'17 ± 0'05
20:4N6	0'58 ± 0'32	0'49 ± 0'25	1'05 ± 0'18
20:5N3	0'39 ± 0'23	0'17 ± 0'05	0'33 ± 0'06
22	1'28 ± 0'33	0'74 ± 0'31	1'30 ± 0'20
22:3N6	0'52 ± 0'28	0'41 ± 0'16	0'67 ± 0'12
22:4N6	0'45 ± 0'18	0'5 ± 0'20	0'54 ± 0'12
22:6N3	0'90 ± 0'14	0'93 ± 0'53	3'07 ± 1'35
24:1	0'75 ± 0'46	2'06 ± 1'17	2'36 ± 0'58*

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * P < 0'05 respecto a los valores iniciales.

Como puede observarse en esta tabla, los ácidos grasos mayoritarios están en proporciones superiores al 5%, aunque algunos de ellos como el palmítico y el linoléico pueden alcanzar porcentajes muy superiores. Resulta evidente cuando se estudia la proporción

TABLA XIV.- Evolución del contenido en ácidos grasos de lípidos totales en mesocarpio de chirimoyas maduras a 12°C.

Ac.GRASO	0 D.T.R.	6 D.T.R.	10 D.T.R.
16	26'91 ± 3'89	27'35 ± 7'26	29'00 ± 1'23
16:1	2'19 ± 1'43	2'80 ± 1'36	2'94 ± 1'14
17	2'04 ± 0'54	1'80 ± 0'39	3'68 ± 0'92
17:1	2'13 ± 1'01	2'98 ± 0'97	2'66 ± 1'05
18	4'33 ± 1'29	4'85 ± 1'21	5'00 ± 1'51
18:1	8'59 ± 2'80	8'13 ± 1'36	5'06 ± 0'79
18:2N6	27'21 ± 3'45	22'13 ± 1'25	25'54 ± 3'60
18:3N6	1'66 ± 1'01	1'07 ± 0'53	0'62 ± 0'44
18:3N3	17'75 ± 1'67	19'37 ± 0'64	17'28 ± 1'86
18:4N3	0'45 ± 0'26	0'24 ± 0'21	0'69 ± 0'30
20	1'36 ± 0'41	1'26 ± 0'49	0'99 ± 0'29
20:1	0'35 ± 0'12	0'48 ± 0'25	0'35 ± 0'18
20:3N6	0'13 ± 0'06	0'40 ± 0'14	0'50 ± 0'28
20:4N6	0'58 ± 0'32	1'24 ± 0'39	0'65 ± 0'31
20:5N3	0'39 ± 0'23	0'32 ± 0'12	0'34 ± 0'19
22	1'28 ± 0'33	1'01 ± 0'28	0'78 ± 0'21
22:3N6	0'52 ± 0'28	0'94 ± 0'37	0'41 ± 0'17
22:4N6	0'45 ± 0'18	0'82 ± 0'34	0'85 ± 0'27
22:6N3	0'90 ± 0'14	1'58 ± 0'55	0'41 ± 0'26
24:1	0'75 ± 0'46	1'23 ± 0'70	2'26 ± 0'62

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. No hay cambios significativos respecto a los valores iniciales.

entre el palmítico y el esteárico, que este último está sujeto a un metabolismo muy activo, siendo rápidamente desaturado por una 9-desaturasa, para producir el ácido oléico, que a su vez es sustrato para dos nuevas reacciones de desaturación, que producen sucesivamente los ácidos C18:2N6 o linoléico y el C18:3N3 o linolénico. Todos ellos englobados dentro de los ácidos grasos que hemos considerado como mayoritarios.

Los ácidos grasos minoritarios alcanzan porcentajes que oscilan entre el 1 y el 2% del total, aunque en determinados estadios estas proporciones pueden variar ampliamente y, por último, los ácidos grasos escasos se presentan casi siempre en porcentajes relativos inferiores al 1%. En ocasiones están presentes en cantidades próximas al límite inferior del detector de ionización de llama empleado.

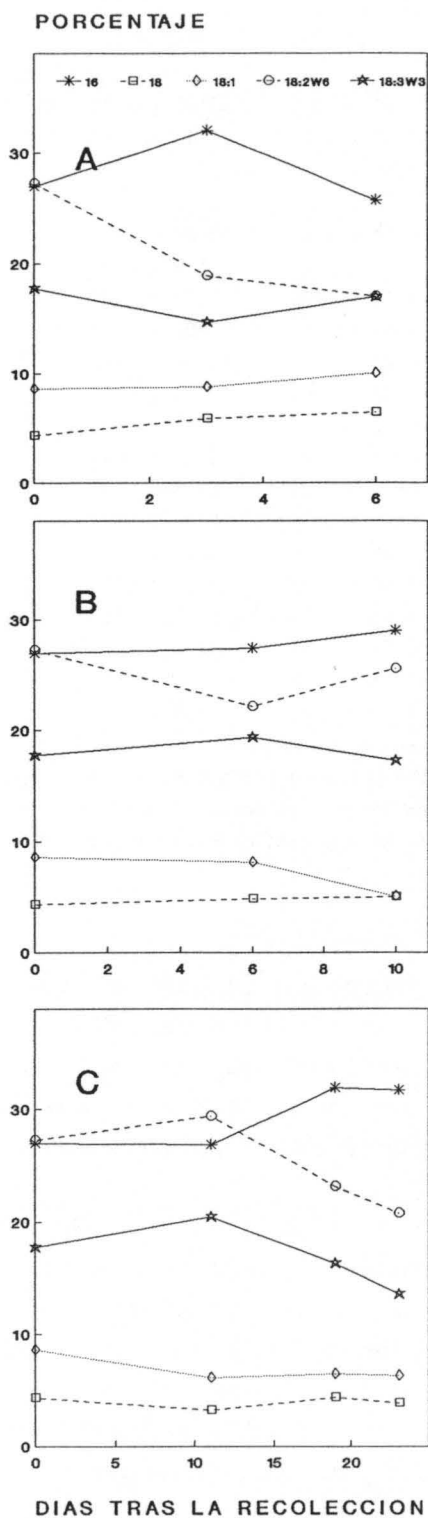
TABLA XV.- Evolución del contenido en ácidos grasos de lípidos totales en mesocarpio de chirimoyas maduras a 4°C.

Ac.GRASO	0 D.T.R.	11 D.T.R.	19 D.T.R.	23 D.T.R.
16	26'91 ± 3'89	26'78 ± 4'46	36'41 ± 3'61	36'35 ± 9'83
16:1	2'19 ± 1'43	3'91 ± 1'93	0'48 ± 0'13	3'31 ± 2'55
17	2'04 ± 0'54	3'11 ± 1'08	1'34 ± 0'67	3'14 ± 0'76
17:1	2'13 ± 1'01	2'19 ± 0'68	1'73 ± 1'31	2'53 ± 1'24
18	4'33 ± 1'29	3'24 ± 0'04	4'36 ± 1'64	3'89 ± 0'87
18:1	8'59 ± 2'80	6'11 ± 1'13	6'49 ± 2'16	6'29 ± 0'56
18:2N6	27'21 ± 3'45	29'32 ± 2'06	23'13 ± 4'03	20'76 ± 7'79
18:3N6	1'66 ± 1'01	0'19 ± 0'08	0'85 ± 0'54	1'06 ± 0'70
18:3N3	17'75 ± 1'67	20'46 ± 1'89	16'28 ± 1'75	13'52 ± 5'07
18:4N3	0'45 ± 0'26	0'28 ± 0'16	0'27 ± 0'05	0'73 ± 0'05
20	1'36 ± 0'41	0'91 ± 0'41	0'47 ± 0'21	2'08 ± 1'41
20:1	0'35 ± 0'12	0'32 ± 0'03	0'13 ± 0'01	1'24 ± 0'48
20:3N6	0'13 ± 0'06	0'13 ± 0'03	0'14 ± 0'03	0'28 ± 0'11
20:4N6	0'58 ± 0'32	0'24 ± 0'13	0'95 ± 0'54	0'75 ± 0'27
20:5N3	0'39 ± 0'23	0'17 ± 0'07	0'44 ± 0'16	0'29 ± 0'08
22	1'28 ± 0'33	1'06 ± 0'40	1'96 ± 0'42	0'88 ± 0'24
22:3N6	0'52 ± 0'28	0'27 ± 0'13	0'98 ± 0'51	0'38 ± 0'2
22:4N6	0'45 ± 0'18	0'57 ± 0'27	0'93 ± 0'31	1'10 ± 0'49
22:6N3	0'90 ± 0'14	0'58 ± 0'18	1'15 ± 0'12	1'04 ± 0'21
24:1	0'75 ± 0'46	0'16 ± 0'10	1'50 ± 0'27	1'39 ± 0'32

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. No hay cambios significativos respecto a los valores iniciales.

Queremos reseñar que cuando la concentración en que se presentan los AG es baja, al error debido a la variabilidad individual de cada fruto, se suman los errores cromatográficos en la detección, por lo que a veces los errores estándar de las medias son bastante elevados, pese a que se hayan realizado numerosas separaciones.

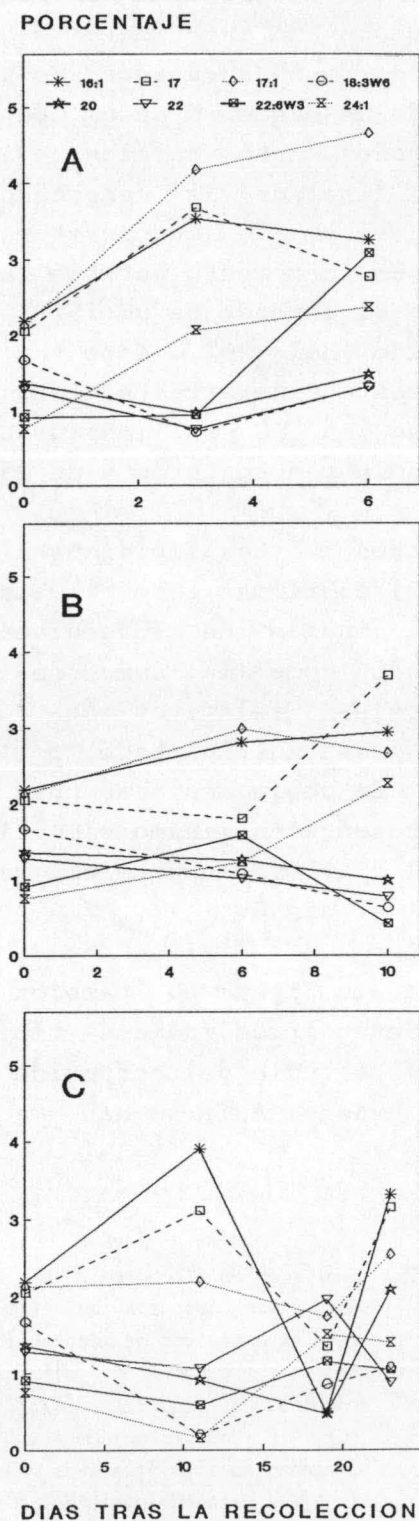
Cuando se analiza individualmente el contenido de los AG mayoritarios, constituyentes de los lípidos totales, durante la maduración a las tres temperaturas seleccionadas, no se aprecian cambios notables (Figura 36), con la única salvedad del C18:2w6 que tiene tendencia a disminuir, aunque la disminución en su concentración sólo es significativa a 22°C. Cuando la conservación se realiza a 4°C el otro AG mayoritario, C18:3w3, acompaña en su descenso al C18:2w6, con una subida casi paralela en el contenido de ácido palmítico.



Respecto a los AG minoritarios (Figura 37), los cambios más acusados corresponden a los AG monoinsaturados, como son los casos del C16:1, C17:1 y C24:1 que ya el tercer día de la maduración a 22°C sufren un incremento en su porcentaje en torno al 100%. A 4°C los perfiles de estos ácidos grasos son escalonados, sin cambios consistentes. Hay que reseñar que pese a que los cambios observados pueden ser grandes, debido a la dispersión de los resultados, que tienen grandes desviaciones estándar, únicamente es significativo al nivel del 95% el incremento en el porcentaje de C24:1 cuando la maduración se realiza a 22°C.

Los AG escasos, presentan también cambios, a veces muy espectaculares, llegando a ser del 300% (Figura 38), sobre todo cuando disminuye la temperatura de conservación de los frutos, pero como en el caso anterior, estas variaciones no son estadísticamente significativas.

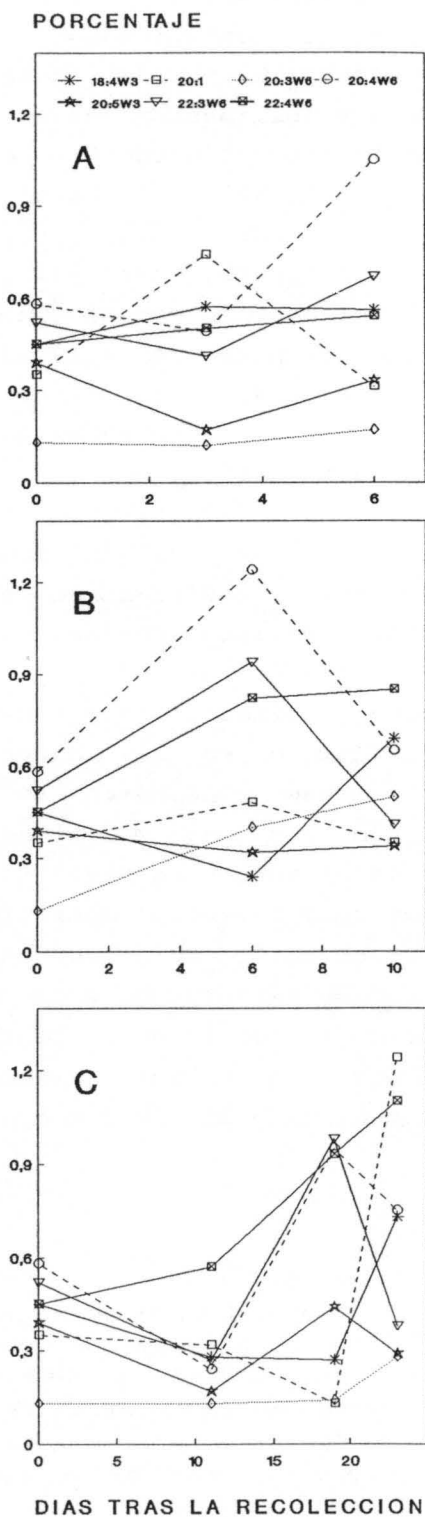
FIGURA 36.- Evolución en el contenido de ácidos grasos mayoritarios en lípidos totales extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.



En la Figura 39 se expresa la evolución del contenido total de AG saturados, insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Cuando los frutos están recién recolectados, el 50% del total de ácidos grasos son poliinsaturados. Del 50% restante, otro 15% son monoinsaturados, quedando únicamente un 35% para los saturados, de los que el ácido palmítico es el más abundante, como se ha estudiado anteriormente.

A 4°C observamos que no se produce ninguna modificación significativa en estos índices a lo largo de todo el periodo de conservación, indicando que cuando hay un cambio en el contenido porcentual de un AG, éste se ve compensado por una modificación contraria en otro o en otros AG de la misma familia. Resultados similares se obtienen en la maduración a 12°C. Únicamente durante la maduración en condiciones controladas se observan cambios aparentes, quedando marcado el día 3 como un

FIGURA 37.- Evolución en el contenido de ácidos grasos minoritarios en lípidos totales extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

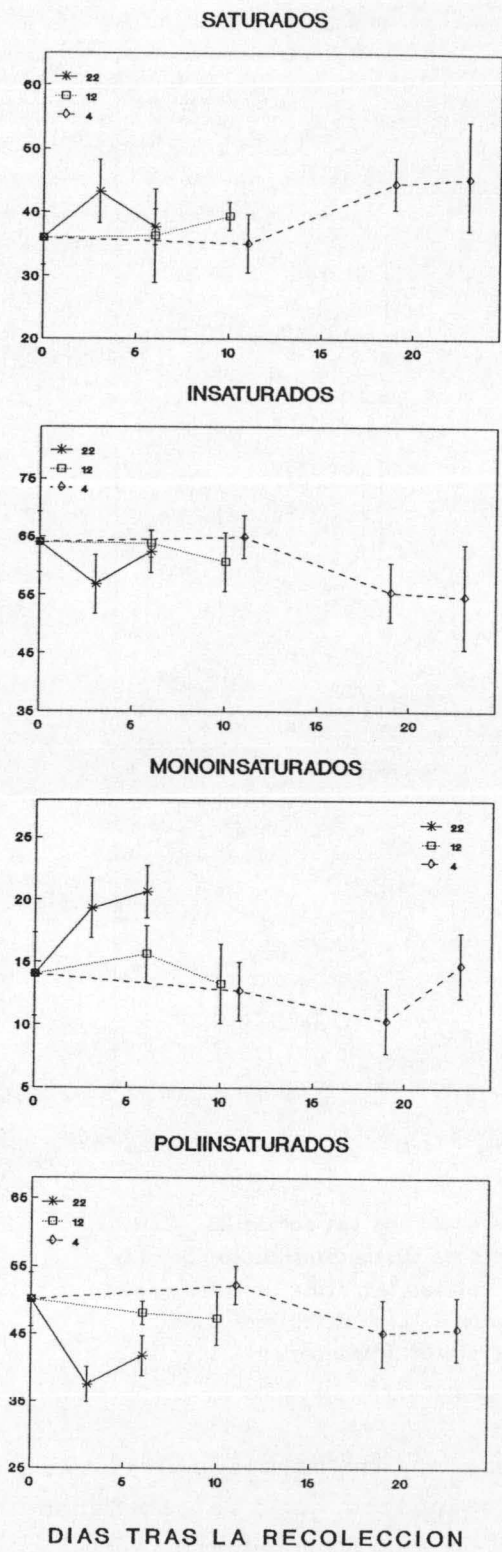


punto de inflexión en el comportamiento del metabolismo lipídico. Se produce un incremento en el contenido de AG saturados acompañado de un descenso en el de AG insaturados. Estos cambios revierten al final de la senescencia. Aunque los AG monoinsaturados sufren un incremento notable hasta el día 3, pasando de un 15% a un contenido del 20%, éste se ve ampliamente contrarrestado por el descenso en AG poliinsaturados, que disminuyen en torno a un 15%.

Otros índices lipídicos (Figura 40) confirman este resultado. Así el índice de insaturación, calculado como la suma de los porcentajes relativos de cada ácido graso multiplicado por el número de dobles enlaces que posee, presenta un mínimo significativo el día 3 y recupera el valor inicial el día 6.

En la Figura 40 también se representan otros índices típicos para el estudio del contenido en ácidos grasos. Así, se han medido

FIGURA 38.- Evolución en el contenido de ácidos grasos escasos en lípidos totales extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.



los contenidos totales de AG de las familias W3 y W6. En estos índices, el peso mayoritario lo aportan respectivamente los AG C18:3N3 y C18:2N6, por lo que su perfil a lo largo de la maduración es similar al de los AG citados.

Los ácidos grasos poliinsaturados son un componente fundamental de las membranas biológicas, estando ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Aparte de su importancia metabólica en plantas, se han hecho muchos esfuerzos para dilucidar sus vías biosintéticas, debido a que son esenciales para el hombre, ya que carecemos de mecanismos para desaturar las cadenas hidrocarbonadas más allá del carbono 9. La vía de síntesis de ácido linoléico en plantas comienza con el ácido esteárico que es sucesivamente desaturado en los carbonos nueve, doce y quince.

Aunque en este trabajo no se ha pretendido conocer la actividad de las desaturasas implicadas

FIGURA 39.- Evolución en el contenido total de ácidos grasos saturados, insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados en mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

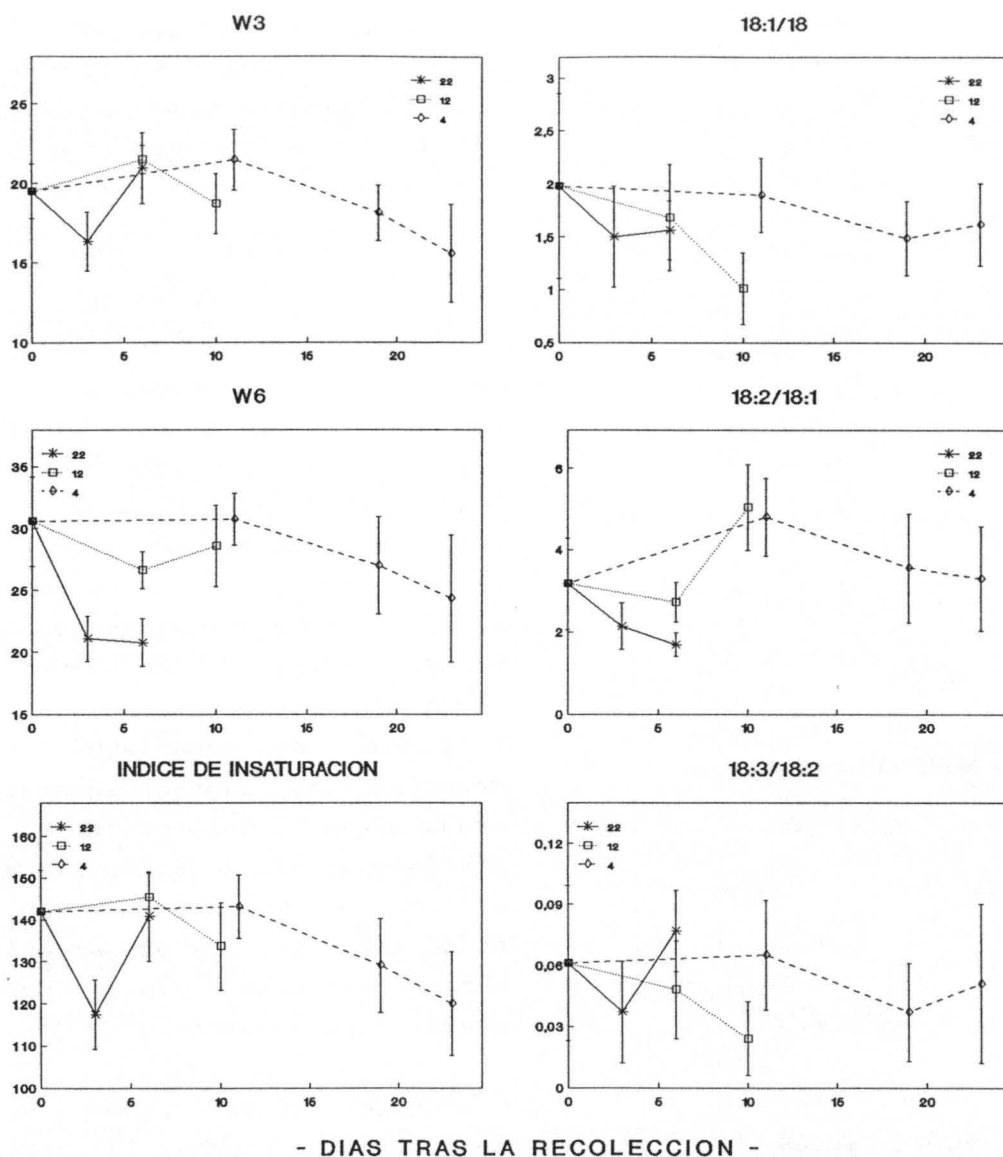


FIGURA 40.- Evolución en el contenido total de ácidos grasos de las series W3 y W6, del índice de insaturación y de las relaciones sustrato/producto de las tres desaturasas mayoritarias en lípidos totales extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

en la biosíntesis de estos AG mayoritarios, nos ha parecido útil el incluir el estudio de la evolución de los índices que se obtienen cuando se divide el contenido porcentual de los AG producto de la acción de las desaturasas entre el de cada uno de sus sustratos.

Un incremento de estos índices puede explicarse por una mayor actividad desaturasa, por el mayor aporte de sustrato, por la mayor retirada de producto o por el incremento o disminución en la concentración de ambos a diferente velocidad. Estos índices tienen tendencia a disminuir durante la maduración a 22°C, salvo la relación linolénico/linoléico, mientras que cuando los frutos se conservan a temperaturas inferiores tienden a incrementarse o permanecen inalterados (Figura 40).

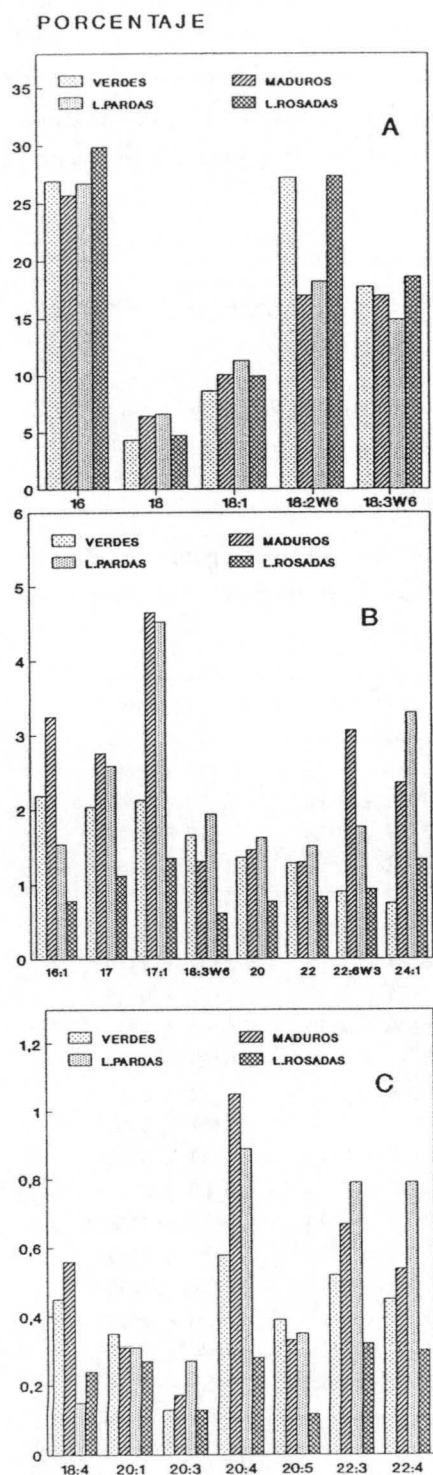
IV.4.1.1.1. LÍPIDOS TOTALES EN EL TEJIDO DAÑADO

Se han realizado también extractos clorofórmicos del tejido dañado, para lo que se realizaba una separación cuidadosa de las

TABLA XVI.- Evolución del contenido en ácidos grasos de lípidos totales en mesocarpio de chirimoyas, dañadas por frío.

Ac.GRASO	VERDES	MADUROS	L.PARDAS	L.ROSADAS
16	26'91 ± 3'89	25'69 ± 2'64	26'70 ± 3'72	29'87 ± 2'48
16:1	2'19 ± 1'43	3'25 ± 1'00	1'54 ± 0'70	0'78 ± 0'12
17	2'04 ± 0'54	2'76 ± 0'50	2'59 ± 0'39	1'12 ± 0'17 ^{bc}
17:1	2'13 ± 1'01	4'65 ± 1'13	4'52 ± 0'99	1'35 ± 0'53 ^{bc}
18	4'33 ± 1'29	6'44 ± 0'77	6'59 ± 0'64	4'72 ± 0'58 ^{bc}
18:1	8'59 ± 2'80	10'05 ± 1'32	11'26 ± 1'17	9'96 ± 1'38
18:2N6	27'21 ± 3'45	17'01 ± 1'88	18'21 ± 2'23 ^a	27'37 ± 1'70 ^{bc}
18:3N6	1'66 ± 1'01	1'31 ± 0'32	1'94 ± 0'27	0'62 ± 0'16 ^c
18:3N3	17'75 ± 1'67	17'00 ± 1'77	14'88 ± 1'95	18'66 ± 1'44
18:4N3	0'45 ± 0'26	0'56 ± 0'16	0'15 ± 0'05 ^b	0'24 ± 0'07
20	1'36 ± 0'41	1'46 ± 0'36	1'62 ± 0'34 ^b	0'77 ± 0'17 ^c
20:1	0'35 ± 0'12	0'31 ± 0'11	0'31 ± 0'10	0'27 ± 0'06
20:3N6	0'13 ± 0'06	0'17 ± 0'05	0'27 ± 0'15	0'13 ± 0'04
20:4N6	0'58 ± 0'32	1'05 ± 0'18	0'89 ± 0'30	0'28 ± 0'10 ^b
20:5N3	0'39 ± 0'23	0'33 ± 0'06	0'35 ± 0'10	0'12 ± 0'02 ^{bc}
22	1'28 ± 0'33	1'30 ± 0'20	1'51 ± 0'24	0'83 ± 0'15
22:3N6	0'52 ± 0'28	0'67 ± 0'12	0'79 ± 0'15	0'32 ± 0'08 ^{bc}
22:4N6	0'45 ± 0'18	0'54 ± 0'12	0'79 ± 0'17	0'30 ± 0'08 ^c
22:6N3	0'90 ± 0'14	3'07 ± 1'35	1'77 ± 0'25	0'94 ± 0'26 ^c
24:1	0'75 ± 0'46	2'36 ± 0'58	3'30 ± 0'59	1'33 ± 0'51 ^c

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. Se indican diferencias significativas pra $P < 0'05$ de la siguiente forma: (°) tejido lesionado comparado con tejido verde, (°) tejido lesionado frente a tejido maduro y (°) lesiones pardas frente a lesiones rosadas.



lesiones observadas, hecho no extremadamente difícil en el caso de las lesiones rosadas por estar perfectamente delimitadas. En las lesiones pardas más difuminadas en todo el mesocarpio resultaba menos precisa la separación de la zona lesionada. En este tejido se han identificado los mismos ácidos grasos que en el mesocarpio de los frutos controles (Tabla XVI).

Al comparar la composición porcentual de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos totales en frutos verdes, maduros y en ambos tipos de lesiones, no aparecen diferencias en cuanto a los porcentajes de los AG mayoritarios, salvo el caso del C18:2w6 que en las lesiones rosadas no disminuye su concentración, como ocurre con el tejido que madura normalmente y con las lesiones pardas (Figura 41).

Respecto a los AG minoritarios, podemos observar que los frutos maduros y las lesiones pardas presentan un contenido semejante en todos los componentes

FIGURA 41.- Concentración de ácidos grasos mayoritarios (a), minoritarios (b) y escasos (c) en tejidos lesionados de chirimoya. Están representados también los contenidos de AG de frutos verdes controles y de frutos madurados a 22°C.

de este grupo y que sus porcentajes son en general superiores a los encontrados en los frutos verdes, mientras que en las lesiones rosadas se encuentran en una proporción muy inferior, destacando el contenido en AG monoinsaturados que no evoluciona como ocurre en la maduración normal. Esto mismo se repite en los AG escasos.

IV.4.1.2 ACIDOS GRASOS LIBRES

Los AG libres se separaron del extracto lipídico por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice y fueron identificados por comparación de la movilidad cromatográfica con patrones adecuados. Posteriormente se procedió a la metilación de estos ácidos grasos, tal como se describió en los apartados III.2.9.1 y III.2.9.2.

TABLA XVII.- Evolución del contenido en ácidos grasos libres en mesocarpio de chirimoyas maduras a 22°C.

Ac. GRASO	0 D.T.R.	3 D.T.R.	6 D.T.R.
16	35'50 ± 9'21	31'88 ± 6'23	30'24 ± 4'45
16:1	5'35 ± 2'14	5'02 ± 3'73	5'40 ± 1'97
17	3'87 ± 0'65	5'74 ± 1'73	6'92 ± 1'99
17:1	6'61 ± 1'82	8'07 ± 2'42	7'67 ± 1'21
18	7'74 ± 1'56	7'18 ± 1'84	8'36 ± 0'96
18:1	14'92 ± 2'44	11'91 ± 2'65	13'67 ± 1'49
18:2N6	4'10 ± 2'93	5'78 ± 2'2	4'05 ± 1'07
18:3N6	4'36 ± 0'84	4'28 ± 1'43	4'47 ± 0'55
18:3N3	3'38 ± 2'86	4'45 ± 1'81	2'81 ± 0'81
18:4N3	0'63 ± 0'14	1'23 ± 0'49	1'07 ± 0'23
20	2'08 ± 0'32	2'40 ± 1'05	2'40 ± 0'68
20:1	0'15 ± 0'05	0'69 ± 0'29	0'29 ± 0'11
20:3N6	0'20 ± 0'08	0'43 ± 0'21	0'41 ± 0'14
20:4N6	1'37 ± 0'33	0'76 ± 0'44	1'11 ± 0'37
20:5N3	0'41 ± 0'12	0'89 ± 0'41	0'89 ± 0'29
22	1'26 ± 0'34	0'84 ± 0'39	1'74 ± 0'56
22:3N6	0'70 ± 0'18	1'09 ± 0'58	0'78 ± 0'24
22:4N6	1'08 ± 0'24	1'60 ± 0'64	1'41 ± 0'24
22:6N3	1'41 ± 0'38	1'49 ± 0'46	1'65 ± 0'32
24:1	4'89 ± 1'09	4'30 ± 2'18	4'64 ± 0'99

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. No hay cambios significativos respecto a los valores iniciales.

TABLA XVIII.- Evolución del contenido en ácidos grasos libres en mesocarpio de chirimoyas maduras a 12°C.

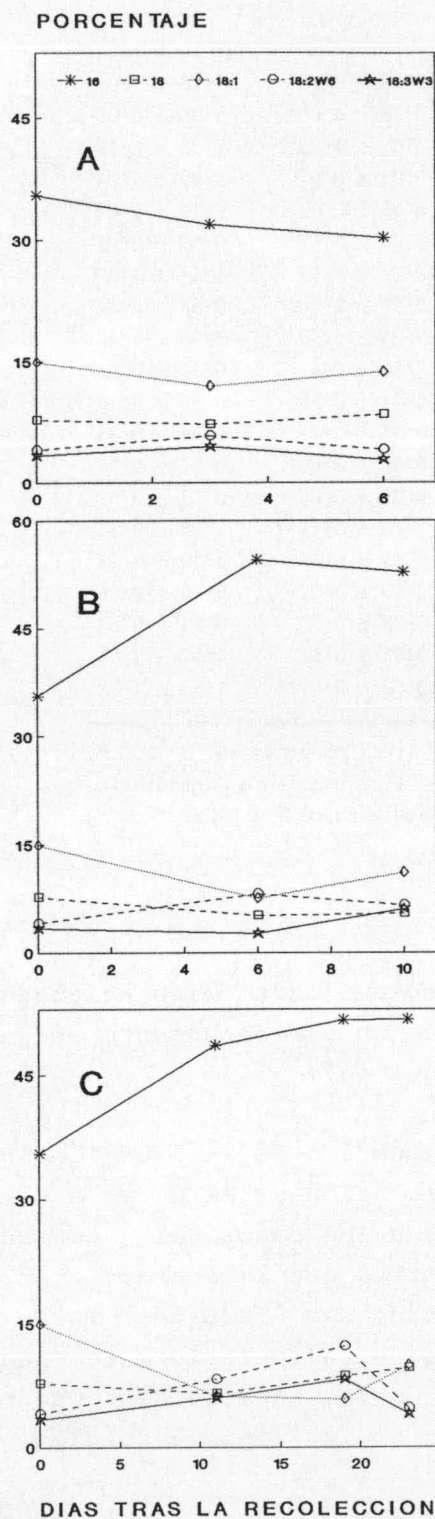
Ac.GRASO	0 D.T.R.	3 D.T.R.	6 D.T.R.
16	35'50 ± 9'21	54'47 ± 4'33	52'75 ± 10'78
16:1	5'35 ± 2'14	0'24 ± 0'17*	0'80 ± 0'27*
17	3'87 ± 0'65	9'84 ± 2'47*	7'35 ± 2'92*
17:1	6'61 ± 1'82	3'51 ± 2'06	3'87 ± 2'27
18	7'74 ± 1'56	7'17 ± 1'16	5'42 ± 0'53
18:1	14'92 ± 2'44	7'55 ± 2'92	11'09 ± 4'41
18:2N6	4'10 ± 2'93	8'17 ± 2'41	6'61 ± 2'01
18:3N6	4'36 ± 0'84	1'70 ± 1'44	1'11 ± 0'64*
18:3N3	3'38 ± 2'86	2'63 ± 0'50	6'05 ± 2'27
18:4N3	0'63 ± 0'14	0'67 ± 0'19	0'51 ± 0'44
20	2'08 ± 0'32	0'88 ± 0'23*	0'43 ± 0'30**
20:1	0'15 ± 0'05	0'82 ± 0'37	0'15 ± 0'10
20:3N6	0'20 ± 0'08	0'08 ± 0'06	0'21 ± 0'15
20:4N6	1'37 ± 0'33	0'16 ± 0'08 *	0'16 ± 0'14**
20:5N3	0'41 ± 0'12	0'27 ± 0'27	0'13 ± 0'08
22	1'26 ± 0'34	0'42 ± 0'25 *	0'76 ± 0'49
22:3N6	0'70 ± 0'18	0'12 ± 0'06 *	0'12 ± 0'07*
22:4N6	1'08 ± 0'24	0'5 ± 0'27 **	0'88 ± 0'51
22:6N3	1'41 ± 0'38	0'41 ± 0'26	0'54 ± 0'33
24:1	4'89 ± 1'09	0'39 ± 0'37	1'03 ± 0'64*

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * P < 0'05, ** P < 0'01 respecto a los valores iniciales.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron determinados por cromatografía gas-líquido. El contenido de los ácidos grasos presentes en la fracción de AG libres obtenida de extractos lipídicos totales de frutos madurados a 22°C, 12°C y 4°C queda reflejado en las Tablas XVII, XVIII y XIX respectivamente.

Hay que destacar que en esta fracción se modifica notablemente el contenido porcentual de los AG identificados. El ácido palmítico es con mucho el más abundante, seguido del ácido oléico. El linoléico que constituye una parte importante del total de ácidos grasos, es ahora minoritario en relación a otros. Esto indica que casi en su totalidad debe encontrarse esterificado.

Los AG myoritarios constituyentes de la fracción de los AG libres no presentan cambios significativos durante la maduración a



las tres temperaturas estudiadas, con la única excepción del ácido palmítico. Su contenido, tanto a 12°C como a 4°C, se eleva apreciablemente, aunque la variación no alcanza a ser significativa estadísticamente (ver figura 42).

En cuanto a los AG minoritarios (Figura 43), al producirse la maduración a 22 °C no se observan variaciones, con la salvedad del C:17 que experimenta un ligero incremento. A 12°C y a 4°C junto al incremento que experimenta el C17, el resto de los ácidos desciende de forma continua desde el comienzo de la maduración post-cosecha hasta el final de la senescencia.

Los AG escasos presentes en esta fracción muestran una inflexión el tercer día de la maduración a 22°C y el sexto día cuando se conservan a 12°C. A esta temperatura es significativo el descenso experimentado por algunos AG

FIGURA 42.- Evolución en el contenido de ácidos grasos mayoritarios en la fracción de ácidos grasos libres, extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas, tras la separación por cromatografía en capa fina. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

TABLA XIX.- Evolución del contenido en ácidos grasos libres en mesocarpio de chirimoyas maduras a 4°C.

Ac. GRASO	0 D.T.R.	11 D.T.R.	19 D.T.R.	23 D.T.R.
16	35'50 ± 9'21	48'57 ± 7'47	51'65 ± 6'12	51'73 ± 9'07
16:1	5'35 ± 2'14	0'89 ± 0'66	0'08 ± 0'08*	5'05 ± 2'03
17	3'87 ± 0'65	6'54 ± 2'62	7'05 ± 1'23**	5'43 ± 2'19
17:1	6'61 ± 1'82	3'84 ± 2'88	0'02 ± 0'02	2'09 ± 1'24
18	7'74 ± 1'56	6'49 ± 0'71	8'63 ± 2'95	9'54 ± 5'81
18:1	14'92 ± 2'44	6'22 ± 2'11*	5'78 ± 0'42**	9'89 ± 6'77
18:2N6	4'10 ± 2'93	8'25 ± 5'55	12'24 ± 6'92	4'67 ± 1'89
18:3N6	4'36 ± 0'84	4'50 ± 3'34	0'57 ± 0'58**	0'88 ± 0'84*
18:3N3	3'38 ± 2'86	5'95 ± 3'66	8'21 ± 6'35	3'96 ± 1'48
18:4N3	0'63 ± 0'14	0'21 ± 0'20	0'40 ± 0'4	0'16 ± 0'08*
20	2'08 ± 0'32	0'68 ± 0'42*	0'61 ± 0'54	0'64 ± 0'16**
20:1	0'15 ± 0'05	0'21 ± 0'16	0'31 ± 0'15	0'34 ± 0'24
20:3N6	0'20 ± 0'08	0'40 ± 0'28	0'00 ± 0'00*	0'17 ± 0'14
20:4N6	1'37 ± 0'33	0'34 ± 0'21*	0'00 ± 0'00**	0'41 ± 0'41
20:5N3	0'41 ± 0'12	0'89 ± 0'19	1'78 ± 0'14***	1'00 ± 0'36
22	1'26 ± 0'34	0'74 ± 0'51	0'34 ± 0'35	3'12 ± 2'53
22:3N6	0'70 ± 0'18	0'06 ± 0'03**	0'00 ± 0'00	0'10 ± 0'06*
22:4N6	1'08 ± 0'24	1'25 ± 0'37	0'73 ± 0'73	0'51 ± 0'32
22:6N3	1'41 ± 0'38	0'73 ± 0'29	0'91 ± 0'62	1'92 ± 1'55
24:1	4'89 ± 1'09	3'71 ± 2'27	0'66 ± 0'49**	1'37 ± 1'28

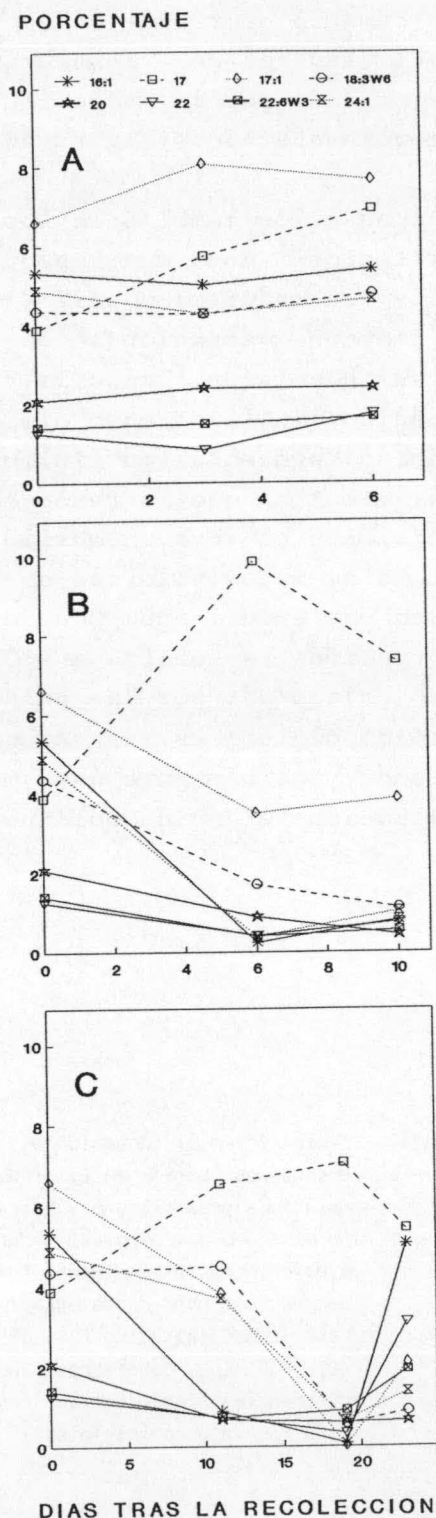
Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza. * P < 0'05, ** P < 0'01, *** P < 0'01 respecto a los valores iniciales.

poliinsaturados de cadena larga. Esta disminución también se produce a 4°C, pero curiosamente hemos encontrado un claro aumento significativo en el contenido de C20:5w3 (Figura 44).

Al estudiar la evolución conjunta de los AG en los índices seleccionados, podemos ver cómo la maduración a 22°C y a 12°C muestra perfiles opuestos, siendo en todos los casos más acusados los cambios experimentados a 12°C, mientras que la conservación a 4°C con variaciones menos importantes se acerca más al comportamiento seguido a 12°C. El inicio del climaterio marca una diferencia en la evolución de cualquiera de los índices estudiados, como ya se había observado en el análisis de los lípidos totales.

En la Figura 45 se observa cómo a 12°C hay una pequeña subida de los AG saturados y un descenso en los AG insaturados,

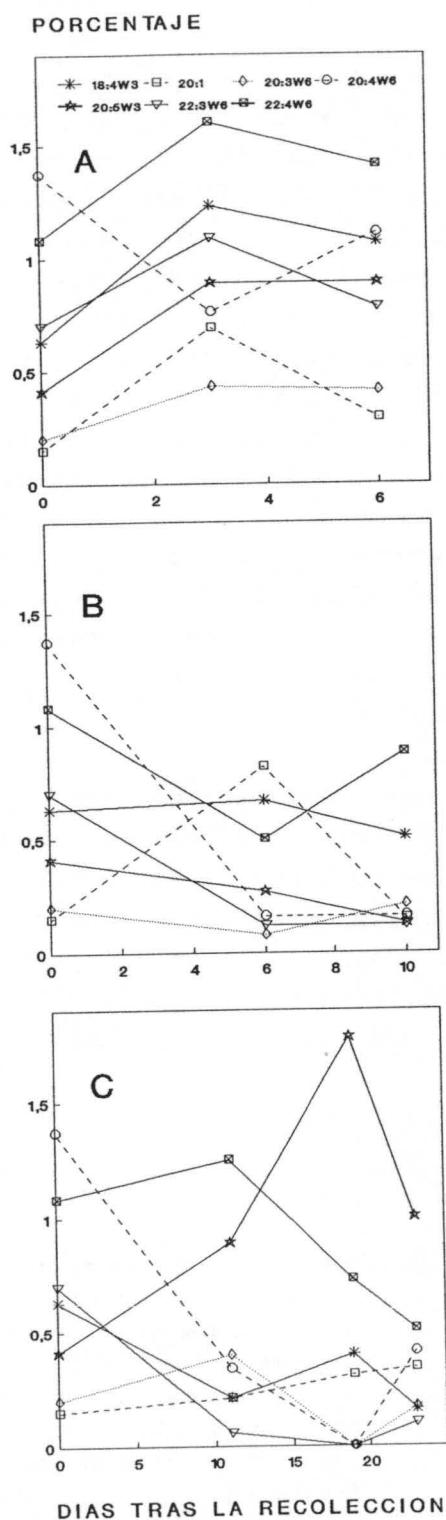
mientras que en la maduración a 22°C no hay cambios apreciables.



Los AG monoinsaturados son los que experimentan la mayor variación, apreciándose un descenso notable hasta el día 6, cuando la maduración se produce a 12°C, mientras que los poliinsaturados no varían significativamente, por lo que el índice de insaturación presenta también un mínimo ese día, a partir del cual revierte hasta el final de la senescencia. A 22°C se produce una elevación menos importante, que tras alcanzar el máximo el día 3 revierte hasta recuperar los valores iniciales al final de la maduración (Figura 46).

Los AG de la serie w6 y los de la serie w3 sufren un pequeño incremento hasta el día 3 para la maduración a 22°C y recuperan el valor inicial al final de la maduración, mientras que a 12°C los de la serie w3 se ven ligeramente

FIGURA 43.- Evolución en el contenido de ácidos grasos minoritarios en la fracción de ácidos grasos libres, extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas, tras la separación por cromatografía en capa fina. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.



incrementados y los de la serie w6 prácticamente no se mueven, por lo que el índice de insaturación viene marcado por la variación de los monoinsaturados (Figura 46).

Aunque los cambios en los AG mayoritarios son muy pequeños durante la maduración a 12°C, sí se producen variaciones en los índices calculados. Tanto la razón linolénico/linoléico como oléico/esteárico presentan un mínimo el día 6, mientras que la razón linoléico/oléico alcanza un máximo ese mismo día. Estos valores se invierten posteriormente. Cuando la conservación se realiza a 4°C el máximo alcanzado por la relación linoléico/oléico es más acusado, indicando posiblemente una mayor movilización del ácido poliinsaturado.

FIGURA 44.- Evolución en el contenido de ácidos grasos escasos en la fracción de ácidos grasos libres, extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas, tras la separación por cromatografía en capa fina. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

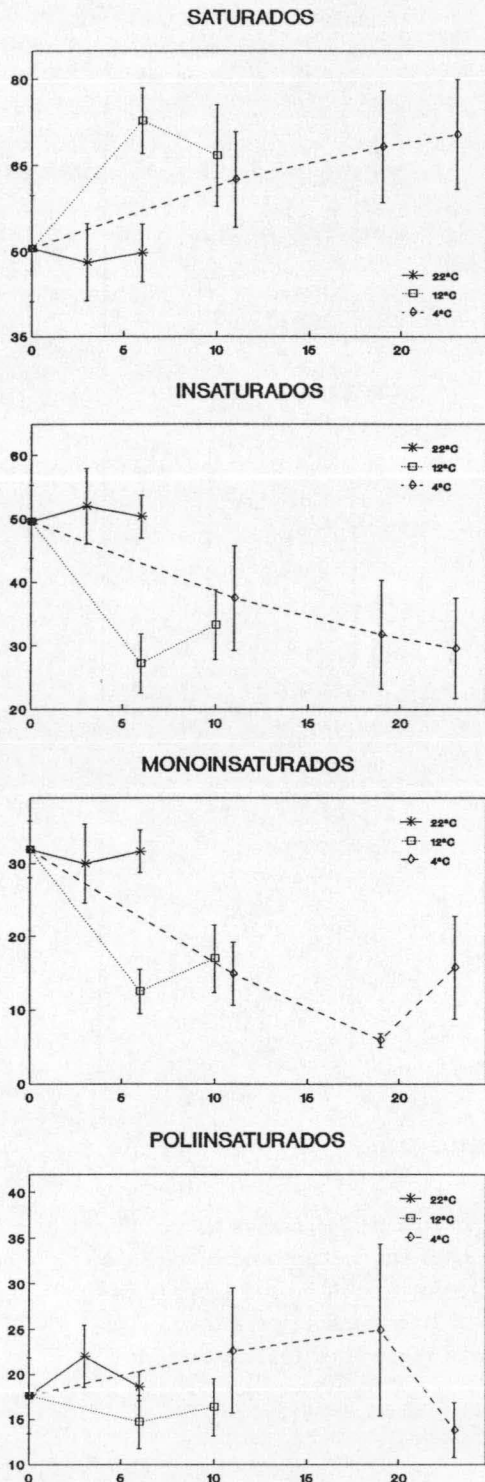


FIGURA 45.- Evolución en el contenido total de ácidos grasos saturados, insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados en la fracción de ácidos grasos libres extraída de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

IV.4.1.3 FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos se separaron del extracto lipídico por cromatografía en capa fina, y posteriormente se procedió a la metilación de sus ácidos grasos. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos fueron determinados por cromatografía gas-líquido. El contenido de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos a 22°C, 12°C y 4°C queda reflejado en las Tablas XX, XXI y XXII.

Las proporciones relativas de los ácidos grasos en esta fracción son muy semejantes a las encontradas en el extracto total. Esto quiere decir que o bien el grueso de los lípidos en mesocarpio de chirimoya está constituido por fosfolípidos, o que en esta fracción, al coincidir con el punto de aplicación de la muestra, quedan lípidos de todas las familias interaccionando con la fase estacionaria, y contaminando por tanto la fracción.

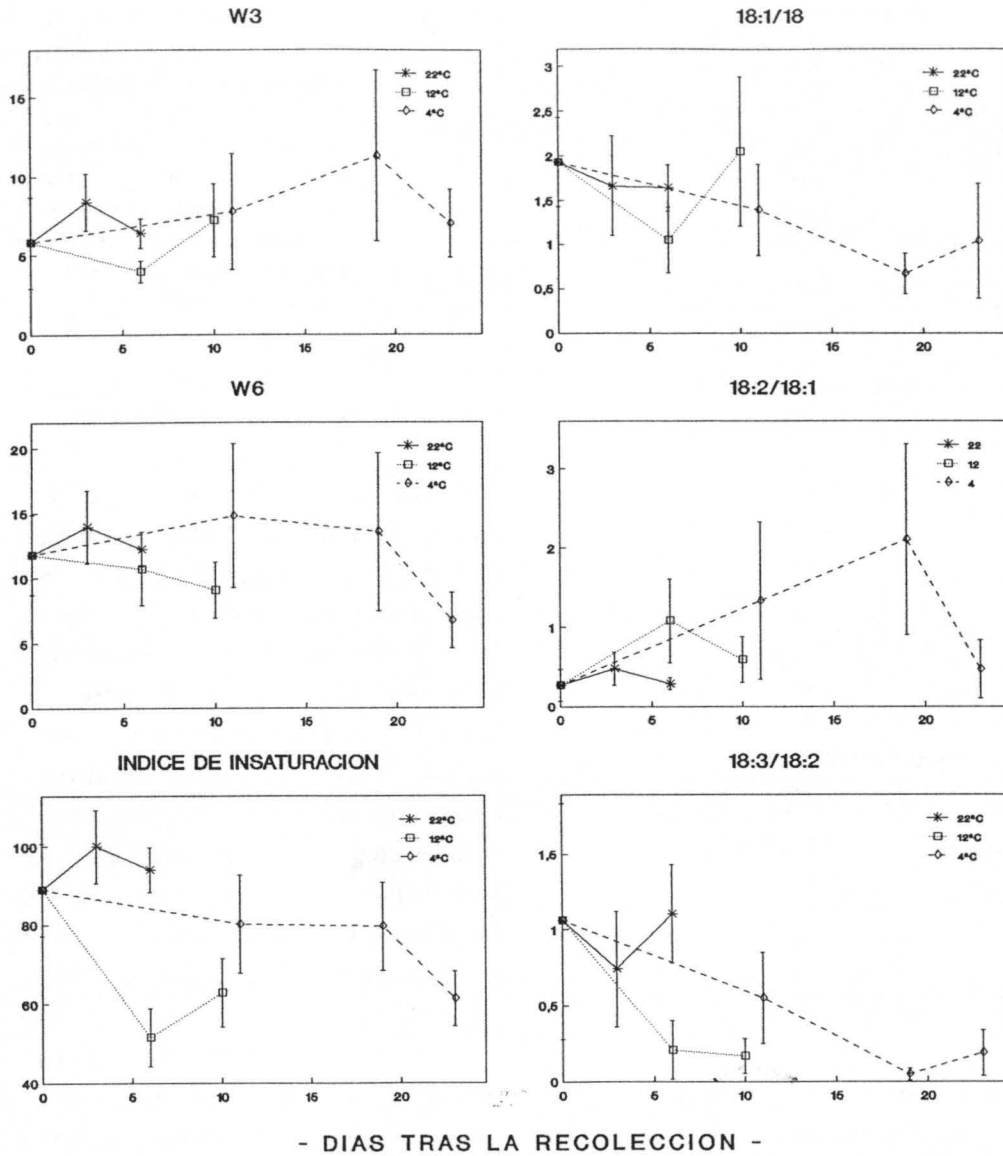


FIGURA 46.- Evolución en el contenido total de ácidos grasos de las series W3 y W6, del índice de insaturación y de las relaciones sustrato/producto de las tres desaturasas mayoritarias en la fracción de ácidos grasos libres extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

Los AG mayoritarios componentes de la fracción de PL en general experimentan las mayores variaciones coincidiendo con el momento en que se dispara el pico de etileno, presentando al final

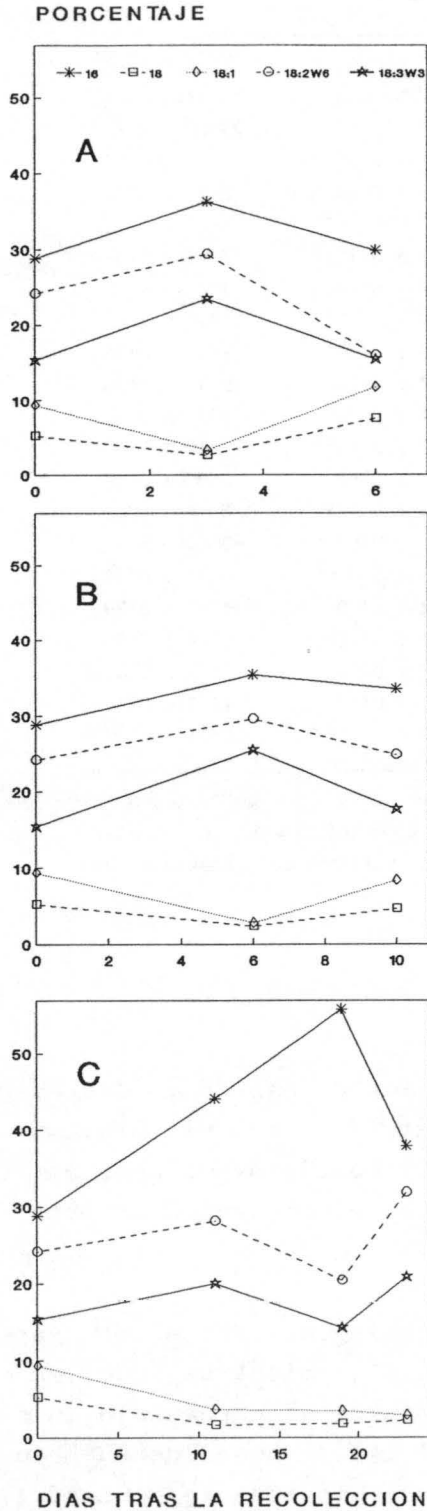
TABLA XX.- Evolución del contenido en ácidos grasos de fosfolípidos en mesocarpio de chirimoyas maduras a 22°C.

Ac.GRASO	0 D.T.R.	3 D.T.R.	6 D.T.R.
16	28'80 ± 2'10	36'22 ± 8'91	29'80 ± 2'41
16:1	1'26 ± 0'33	0'99 ± 0'30	1'54 ± 0'54
17	1'50 ± 0'31	1'33 ± 0'34	2'31 ± 0'36
17:1	2'67 ± 0'63	0'30 ± 0'24**	3'27 ± 0'67*
18	5'21 ± 0'68	2'61 ± 0'11**	7'52 ± 0'67
18:1	9'33 ± 1'04	3'31 ± 0'49	11'76 ± 0'99
18:2N6	24'18 ± 1'87	29'29 ± 4'51	15'91 ± 1'27**
18:3N6	2'10 ± 0'72	0'28 ± 0'21*	2'35 ± 0'38
18:3N3	15'35 ± 1'24	23'37 ± 4'54	15'44 ± 1'36
18:4N3	0'71 ± 0'30	0'01 ± 0'01*	0'28 ± 0'07
20	1'35 ± 0'29	0'18 ± 0'03**	1'10 ± 0'23
20:1	0'1 ± 0'06	0'02 ± 0'02	0'06 ± 0'02
20:3N6	0'18 ± 0'05	0'04 ± 0'02*	0'14 ± 0'03
20:4N6	0'54 ± 0'09	0'03 ± 0'02***	0'61 ± 0'12
20:5N3	0'12 ± 0'02	0'03 ± 0'02**	0'33 ± 0'11
22	1'58 ± 0'17	1'02 ± 0'40	1'85 ± 0'29
22:3N6	0'60 ± 0'10	0'23 ± 0'12*	0'62 ± 0'08
22:4N6	0'87 ± 0'17	0'07 ± 0'04***	0'73 ± 0'01
22:6N3	1'24 ± 0'17	0'54 ± 0'17*	1'41 ± 0'17
24:1	2'26 ± 0'52	0'11 ± 0'11**	2'95 ± 0'47

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza.

de la senescencia valores muy próximos a los de partida, destacando como más significativo el descenso sufrido por el C18:2w6 al producirse la maduración a 22°C o a 12°C. Cuando se conservan los frutos a 4°C no se produce una reversión en el contenido de este AG (Figura 47).

En cuanto a los AG minoritarios, ninguno de ellos supera inicialmente un porcentaje superior al 4%, mientras que en la fracción correspondiente a los lípidos totales el porcentaje inicial se aproxima al 7% y en los AGL alcanza el 14%. A pesar de su pequeña abundancia experimentan cambios de cierta importancia. Cuando la maduración se produce tanto a 22°C como a 12°C se produce un



descenso de los AG monoinsaturados C16:1, C17:1 y C24:1 dando unos valores mínimos coincidentes con el inicio del pico de etileno a ambas temperaturas, a partir de aquí comienza un incremento que hace que al final de la senescencia sus porcentajes sean similares a los de partida o en ocasiones ligeramente superiores. Un comportamiento semejante se observa para la conservación a 4°C, con la diferencia de que el brusco descenso va seguido de una subida muy suave, presentando al final del periodo de conservación unos valores inferiores a los iniciales, Figura 48.

Los AG escasos componentes de esta fracción también participan inicialmente con unos porcentajes inferiores a los encontrados en los lípidos totales y AG libres. Al producirse la maduración a 22°C o a 12°C muestran una disminución

FIGURA 47.- Evolución en el contenido de ácidos grasos mayoritarios en la fracción de fosfolípidos, extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas, tras la separación por cromatografía en capa fina. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

TABLA XXI.- Evolución del contenido en ácidos grasos de fosfolípidos en mesocarpio de chirimoyas maduras a 12°C

Ac.GRASO	0 D.T.R.	6 D.T.R.	10 D.T.R.
16	28'80 ± 2'10	35'36 ± 3'20	33'54 ± 4'54
16:1	1'26 ± 0'33	0'55 ± 0'06	1'36 ± 0'72
17	1'50 ± 0'31	1'08 ± 0'03	1'30 ± 0'30
17:1	2'67 ± 0'63	0'11 ± 0'10**	1'46 ± 0'77
18	5'21 ± 0'68	2'35 ± 0'42**	4'62 ± 0'86
18:1	9'33 ± 1'04	2'82 ± 0'64**	8'35 ± 3'19
18:2N6	24'18 ± 1'87	29'52 ± 1'07*	24'80 ± 1'69
18:3N6	2'10 ± 0'72	0'06 ± 0'01*	1'06 ± 0'62
18:3N3	15'35 ± 1'24	25'42 ± 1'01***	17'60 ± 1'38
18:4N3	0'71 ± 0'30	0'04 ± 0'03*	0'07 ± 0'03
20	1'35 ± 0'29	0'13 ± 0'06**	0'82 ± 0'31
20:1	0'13 ± 0'06	0'03 ± 0'02	0'08 ± 0'03
20:3N6	0'18 ± 0'05	0'07 ± 0'02	0'12 ± 0'02
20:4N6	0'54 ± 0'09	0'02 ± 0'02***	0'29 ± 0'12
20:5N3	0'12 ± 0'02	0'11 ± 0'11	0'13 ± 0'06
22	1'58 ± 0'17	1'39 ± 0'29	1'56 ± 0'46
22:3N6	0'60 ± 0'10	0'20 ± 0'10*	0'37 ± 0'10
22:4N6	0'87 ± 0'17	0'04 ± 0'04***	0'42 ± 0'16
22:6N3	1'24 ± 0'17	0'46 ± 0'18**	0'82 ± 0'24
24:1	2'26 ± 0'52	0'24 ± 0'12**	1'23 ± 0'67

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza.

los días 3 o 6 respectivamente, con tendencia a recuperar los valores iniciales posteriormente. A 4°C esta recuperación no se produce (Figura 49).

El estudio de los diferentes índices nos confirma que la maduración a 22°C y a 12°C es muy similar, aunque desplazada en el tiempo, mientras que a 4°C el perfil es muy diferente.

No se observa una modificación en el contenido total de AG saturados o insaturados, aunque sí en las composiciones relativas de los mismos (Figura 50).

Los AG monoinsaturados presentan una disminución muy aparente

TABLA XXII.- Evolución del contenido en ácidos grasos de fosfolípidos en mesocarpio de chirimoyas maduras a 4°C

Ac.GRASO	0 D.T.R.	11 D.T.R.	19 D.T.R.	23 D.T.R.
16	28'80±2'10	44'04±3'77**	55'84±8'52**	37'92±8'95
16:1	1'26±0'33	0'70±0'03	0'45±0'17	0'60±0'05
17	1'50±0'31	0'81±0'19	0'95±0'55	0'93±0'03
17:1	2'67±0'63	0'05±0'03**	0'08±0'04**	0'26±0'22**
18	5'21±0'68	1'56±0'47**	1'79±0'55**	2'22±0'53**
18:1	9'33±1'04	3'62±0'71***	3'48±0'69***	2'86±0'84***
18:2N6	24'18±1'87	28'10±2'11	20'46±6'85	31'86±4'50
18:3N6	2'10±0'72	0'11±0'08*	0'24±0'16*	0'10±0'00*
18:3N3	15'35±1'24	20'04±0'90	14'24±5'68	20'86±2'02*
18:4N3	0'71±0'30	0'01±0'01	0'06±0'01	0'04±0'03
20	1'35±0'29	0'03±0'02***	0'30±0'26*	0'10±0'06**
20:1	0'13±0'06	0'01±0'01	0'07±0'02	0'05±0'05
20:3N6	0'18±0'05	0'42±0'13	0'15±0'09	0'10±0'09
20:4N6	0'54±0'09	0'02±0'01***	0'27±0'08	0'02±0'02***
20:5N3	0'12±0'02	0'03±0'01**	0'08±0'06	0'02±0'01***
22	1'58±0'17	0'29±0'08***	0'59±0'30*	0'86±0'40
22:3N6	0'60±0'10	0'06±0'03***	0'15±0'05**	0'27±0'14
22:4N6	0'87±0'17	0'07±0'06***	0'21±0'03	0'20±0'10**
22:6N3	1'24±0'17	1'22±0'19	0'28±0'15**	0'70±0'30
24:1	2'26±0'52	0'11±0'07	0'35±0'30*	0'03±0'02**

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. de al menos seis frutos determinados en triplicado. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado por análisis de varianza.

que tanto a 12°C como a 22°C coincide con el pico de etileno y revierte hasta superar los valores control en el caso de los frutos madurados a 22°C. Cambios opuestos a los observados para los AG poliinsaturados. Los cambios más aparentes están de acuerdo con la secuencia de síntesis C16 — C18 — C18:1 — C18:2w6 — C18:3w6, y de utilización de los AG poliinsaturados.

Durante los primeros días de la maduración a 22°C o a 12°C la ruta sintética podría ser activa con lo que se acumularían los AG poliinsaturados. El inicio del pico climatérico produciría un fuerte descenso en el contenido de linoléico y linolénico. Estos cambios se ven confirmados con el estudio de los índices entre los distintos AG de 18 carbonos (Figura 51). Durante la maduración a 4°C no se producen estos cambios en el contenido, fundamentalmente de ácido linoléico.

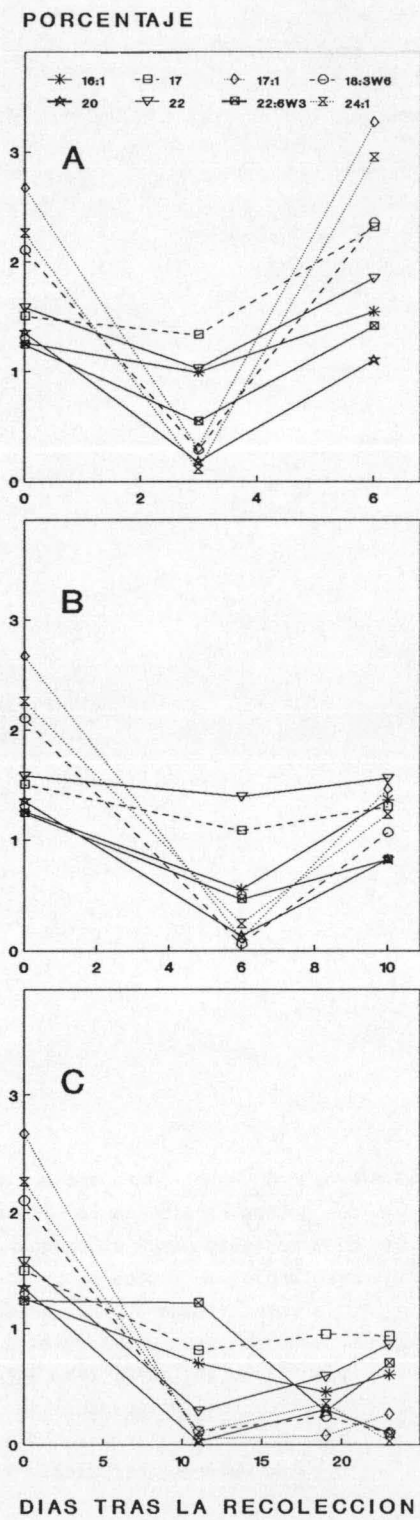


FIGURA 48.- Evolución en el contenido de ácidos grasos minoritarios en la fracción de fosfolípidos, extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas, tras la separación por cromatografía en capa fina. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

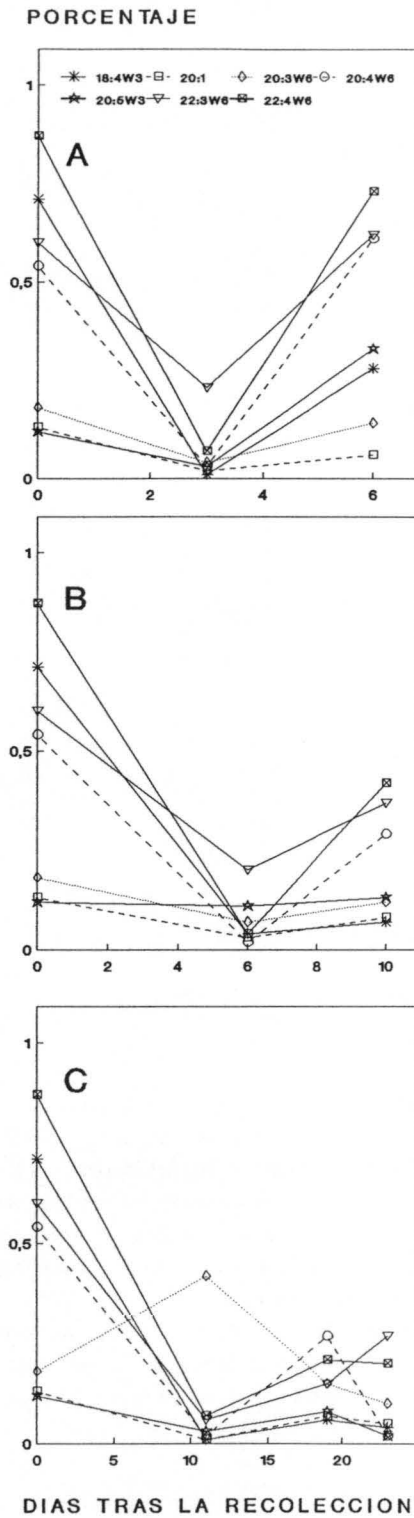


FIGURA 49.- Evolución en el contenido de ácidos grasos escasos en la fracción de fosfolípidos, extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas, tras la separación por cromatografía en capa fina. (A) 22°C, (B) 12°C y (C) 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

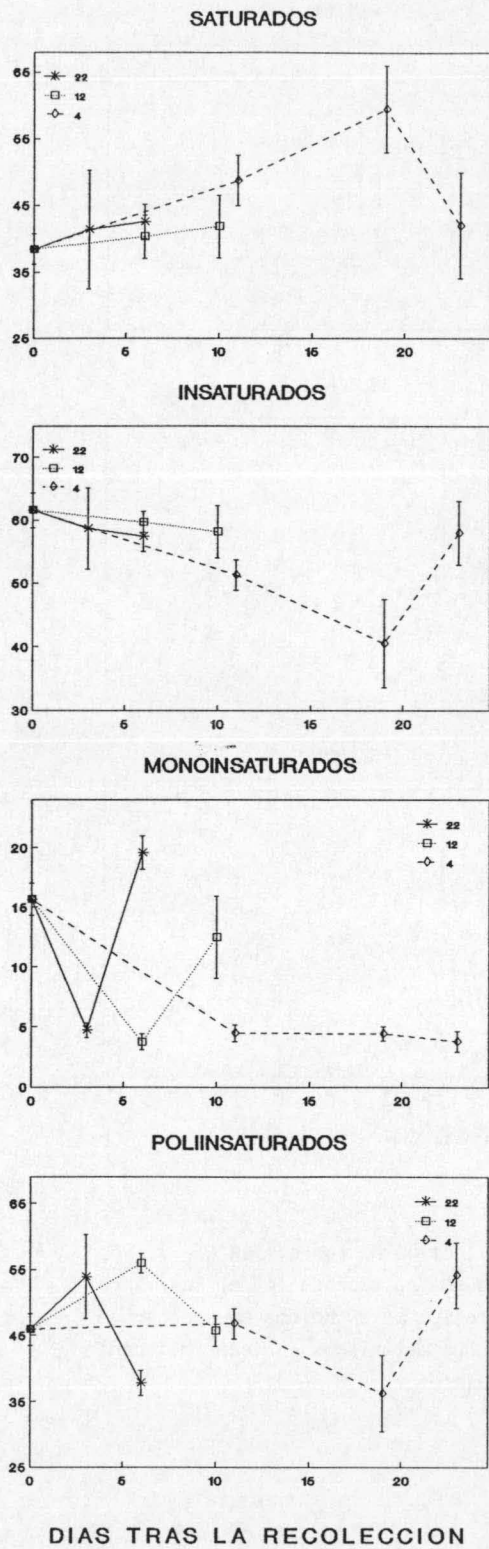


FIGURA 50.- Evolución en el contenido total de ácidos grasos saturados, insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados en la fracción de fosfolípidos extraída de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

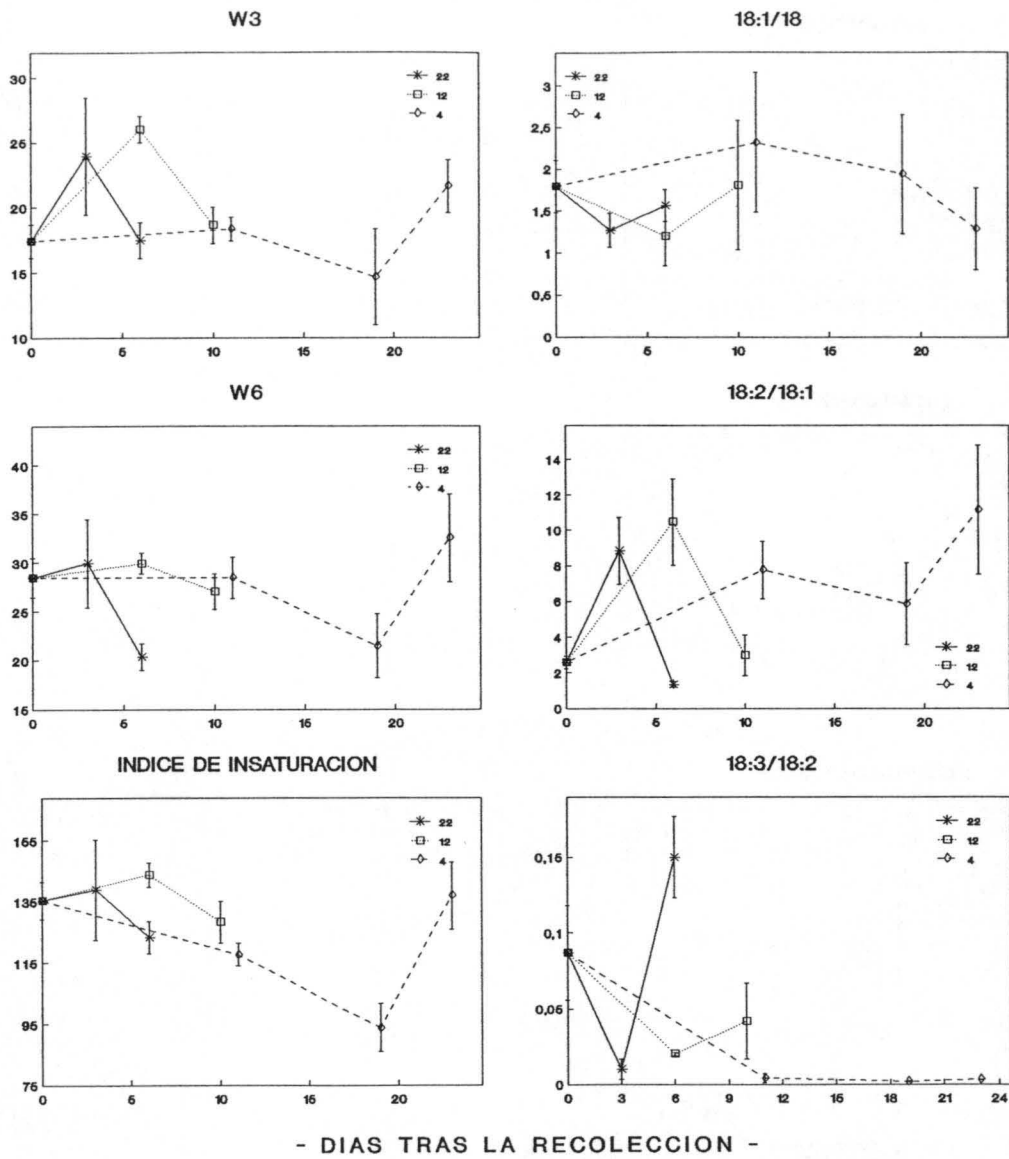


FIGURA 51.- Evolución en el contenido total de ácidos grasos de las series W3 y W6, del índice de insaturación y de las relaciones sustrato/producto de las tres desaturasas mayoritarias en la fracción de fosfolípidos extraídos de mesocarpio de frutos madurados a diferentes temperaturas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

IV.4.1.3.1. FOSFORO LIPIDICO

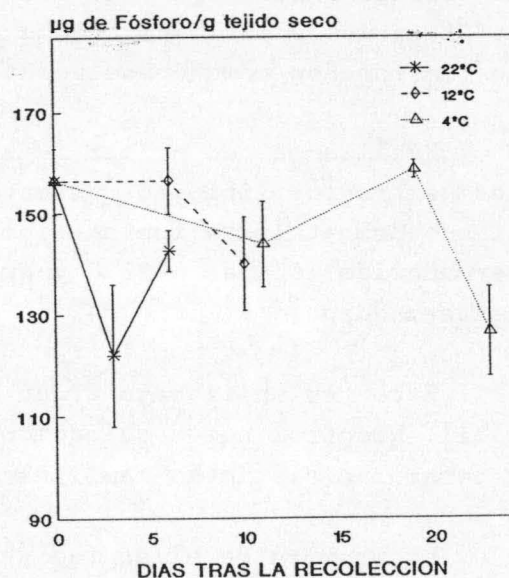
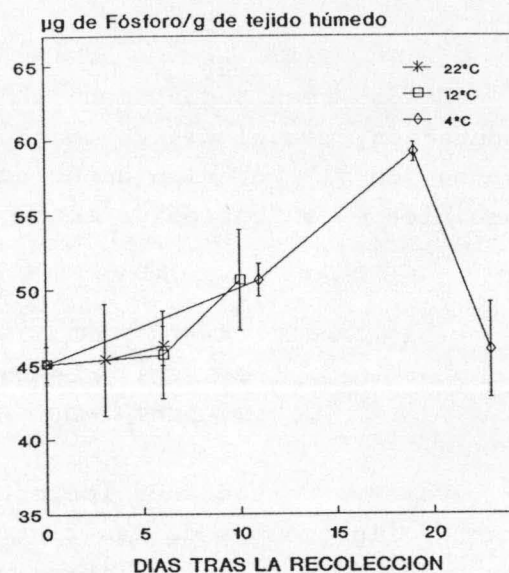
Un aspecto muy importante durante la maduración, que está en discusión en distintos tipos de frutos, es la concentración total de fosfolípidos a lo largo de la maduración.

Nosotros hemos determinado el contenido total de fósforo en los extractos lipídicos (Figura 52).

FIGURA 52.- Evolución del contenido en fósforo en extractos clorofórmicos de mesocarpio de chirimoyas maduras a diferentes temperaturas.

Cuando los resultados son expresados en relación al peso húmedo del tejido, el único cambio significativo ocurre al final de la conservación a 4°C y se manifiesta como un incremento considerable, lo que induciría a pensar en una elevación del contenido de fosfolípidos. Cuanto mayor es el periodo de conservación de los frutos mayor es su pérdida de peso, pudiendo llegar a valores del 25% al 30% del peso inicial. En gran parte este fenómeno es debido a pérdidas de agua por transpiración, ya que se ve fuertemente incrementado cuando disminuye la humedad relativa de la atmósfera que rodea al fruto.

Teniendo en cuenta este comportamiento, es más correcto expresar los resultados en función del peso seco del tejido. En este caso



encontramos nuevamente que durante la maduración a 22°C, el día tres constituye un punto crucial en el proceso, presentándose un mínimo en el contenido de fósforo lipídico. Cuando los frutos se conservan a 12°C o a 4°C se produce un descenso al final del periodo de conservación, momento en que las membranas deben estar más deterioradas.

Estos resultados indican que no sólo debe haber durante la maduración reacciones de remodelado de fosfolípidos, con modificaciones en el contenido de ácidos grasos, sino también cambios sustanciales en su contenido total.

IV.4.2 COMPOSICION LIPIDICA DEL MESOCARPIO DE CHIRIMOYAS VERDES, MADURAS Y DAÑADOS POR FRIO.

Una vez estudiados los contenidos de ácidos grasos de los extractos lipídicos y de las fracciones cromatográficas correspondientes a los ácidos grasos libres y a los fosfolípidos, decidimos hacer un trabajo seriado para establecer, en una primera aproximación, las modificaciones más importantes del metabolismo lipídico en los tejidos lesionados como consecuencia del almacenamiento en frío.

Realizamos en primer lugar una cromatografía en capa fina de los extractos lipídicos de estos tejidos y de los controles, eligiendo como tales a frutos recién recolectados y a frutos que habían permanecido 6 días a 22°C y que se encontraban por tanto completamente maduros.

Este es un trabajo árduo y cuya interpretación es a veces difícil. Nosotros hemos seleccionado dos técnicas cromatográficas para separar las distintas familias lipídicas.

La primera de ellas fue ya utilizada en el capítulo precedente para el estudio de fosfolípidos y AG libres durante la maduración. En ella la fase móvil es muy apolar, por lo que los fosfolípidos fundamentalmente quedan en el punto de aplicación. No obstante, dado que se producía una separación muy aceptable de otras especies lipídicas, fue utilizada también para este estudio.

En la segunda técnica se empleó una fase móvil más polar, con lo que los fosfolípidos se separan unos de otros, siendo posible

identificar algunos tipos, especialmente los más abundantes.

No se pretendió hacer una evaluación en profundidad de todas las alteraciones encontradas, ni de los posibles mecanismos que las han podido originar. Únicamente hemos pretendido hacer un análisis general de la composición porcentual de las familias lipídicas presentes, así como de la composición de ácidos grasos en cada una de las bandas cromatográficas para, posteriormente, poder profundizar en los mecanismos bioquímicos responsables de las alteraciones que puedan aparecer como los mayores responsables de las lesiones.

Al determinar el contenido en fósforo presente en el extracto lipídico total, procedente del tejido lesionado, no encontramos diferencias significativas con respecto a los controles cuando se expresa con referencia al peso de tejido húmedo, pero sí es significativamente menor al expresarlo frente al peso de tejido seco, lo que indica una disminución elevada en los niveles de fosfolípidos en los tejidos lesionados (Tabla XXIII).

TABLA XXIII.- Contenido en fósforo en extractos lipídicos de frutos verdes, maduros y lesionados.

	$\mu\text{g P} \times \text{g}^{-1}$ tejido húmedo	$\mu\text{g P} \times \text{g}^{-1}$ tejido seco
VERDES	45'06 \pm 1'18	156'34 \pm 6'57
MADUROS	46'25 \pm 1'30	142'52 \pm 4'03
L.PARDAS	36'41 \pm 3'20	107'50 \pm 8'20*
L.ROSADAS	49'68 \pm 1'63	84'03 \pm 4'71*

* $P < 0'05$ cuando se comparan los tejidos lesionados con los tejidos verdes, aplicando el test de la "t" de Student.

IV.4.2.1. TLC -FASE MOVIL APOLAR.

El desarrollo de esta cromatografía nos permitió separar el extracto lipídico en once especies distintas, que al ser reveladas con yodo presentaban ciertas diferencias en el tejido lesionado y en los controles y entre los frutos verdes y los maduros (Lámina I). Con objeto de poder conocer la evolución del metabolismo de estas especies lipídicas, llevamos a cabo la saponificación y metilación de cada una de las bandas para posteriormente analizar por cromatografía gas-líquido los ésteres metílicos de los ácidos grasos constituyentes de cada banda.

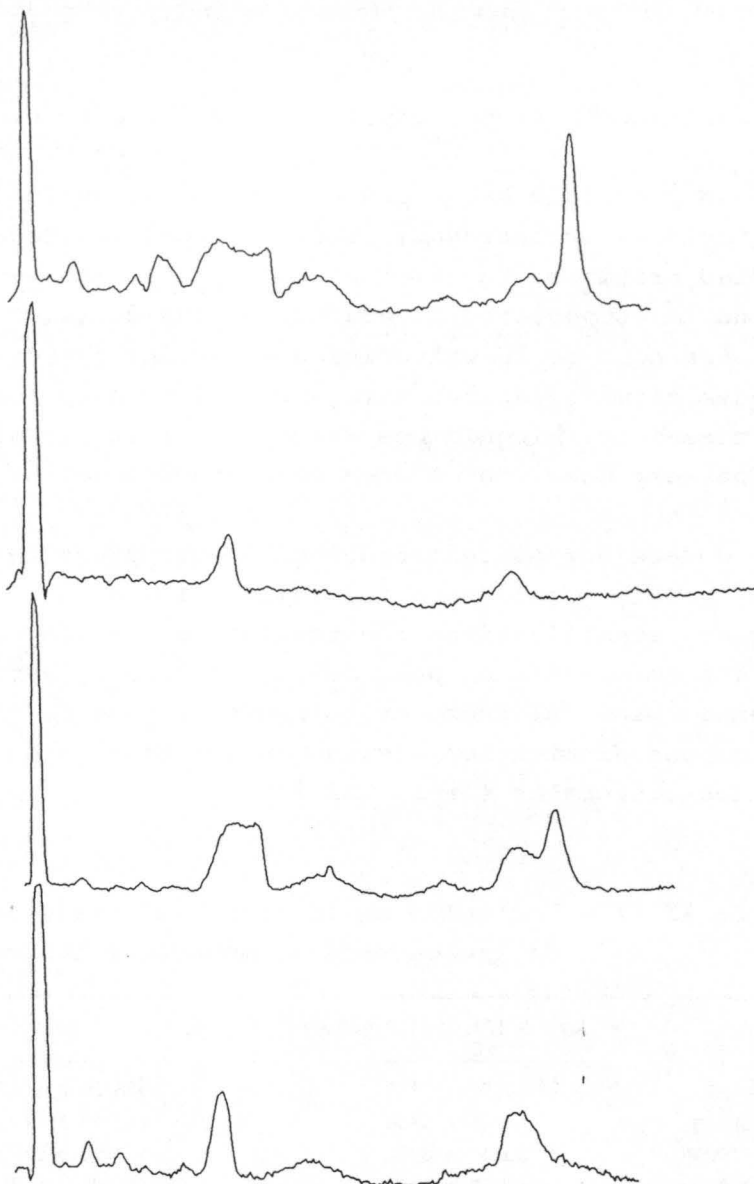


FIGURA 53.- Fotodensitogramas de las placas cromatográficas en las que se han separado por TLC (Hexano:eter etílico:Acido acético) los lípidos extraídos de tejidos lesionados de chirimoyas o de frutos en distinto estado de maduración.

IV.4.2.2. ESTUDIO DE LAS BANDAS CROMATOGRÁFICAS.

A las placas reveladas con iodo se les realizó inmediatamente una fotodensitometría, para evaluar la abundancia relativa de cada banda dentro de una misma condición y conocer la evolución de éstas en los tejidos lesionados frente a los controles (Figura 53).

Los porcentajes relativos de cada banda en las diferentes condiciones se muestran en la Tabla XXIV y Figura 54. No consideramos que este tipo de análisis sea el adecuado como método de cuantificación de las especies lipídicas constituyentes, ya que depende de la interacción del iodo con los lípidos, especialmente con los dobles enlaces de las cadenas de ácidos grasos, en los que pueden producirse reacciones de adición. Estas interacciones son en muchos casos muy transitorias, existiendo diferencias entre las distintas especies lipídicas, de forma que algunas bandas mantienen el color durante largos periodos de tiempo, mientras que otras lo pierden inmediatamente.

Aunque la determinación fotodensitométrica de cada cromatograma no se prolongaba más de un minuto, era tiempo suficiente como para que algunas bandas disminuyeran sensiblemente la absorción de luz. No obstante, dado que las comparaciones se realizan banda a banda entre los distintos tipos de tejidos, creemos que sí que constituyen una estimación adecuada de los cambios en el contenido, especialmente cuando éste es sensiblemente diferente.

El empleo de patrones nos ha permitido identificar algunas

TABLA XXIV.- % en peso de las diferentes bandas obtenidas en la cromatografía en capa fina, empleando como líquido de desarrollo "Hexano:eter etílico:Acido acético".

BANDA	VERDE	MADURO	L.PARDAS	L.ROSADAS	IDENTIFICACION
1	34'65 ± 2'65	29'43 ± 1'19	40'81 ± 1'83 ^b	20'06 ± 0'34 ^{ab}	PL
2	0'68 ± 0'17	1'50 ± 0'65	0'66 ± 0'29	0'56 ± 0'19	MG
3	3'32 ± 0'32	2'25 ± 0'76	2'13 ± 0'25 ^a	3'25 ± 0'68	
4	3'21 ± 0'37	1'25 ± 0'67 ^a	1'50 ± 0'46 ^a	1'22 ± 0'27 ^a	
5	0'88 ± 0'12	2'54 ± 0'68 ^a	0'86 ± 0'14 ^b	2'77 ± 0'10 ^a	DG
6	1'54 ± 0'20	2'34 ± 0'80	1'61 ± 0'28	5'94 ± 0'68 ^{ab}	
7	15'56 ± 1'17	27'09 ± 0'56 ^a	20'54 ± 1'79 ^{ab}	23'27 ± 0'31 ^{ab}	AGL
8	8'57 ± 1'06	8'15 ± 1'33	5'97 ± 0'58	10'22 ± 0'53	TG
9	5'18 ± 0'73	3'36 ± 0'23 ^a	2'75 ± 0'52 ^a	3'29 ± 0'53	
10	21'68 ± 1'00	10'37 ± 0'95 ^a	16'04 ± 1'43 ^{ab}	8'56 ± 0'46 ^a	EE
11	4'70 ± 0'65	11'59 ± 2'66 ^a	5'10 ± 1'01 ^b	20'80 ± 2'16 ^{ab}	EE

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. El tratamiento estadístico se ha realizado de acuerdo con el test de la "t" de Student. ^a y ^b = P < 0'05 cuando se comparan respectivamente el tejido verde con los demás o el tejido maduro con los lesionados. PL = Fosfolípidos. MG = Monoacilglicerol. DG = Diacilglicerol. AGL = Acidos grasos libres. TG = Triacilglicerol. EE = Esterol. EE = Esterol esterificados.

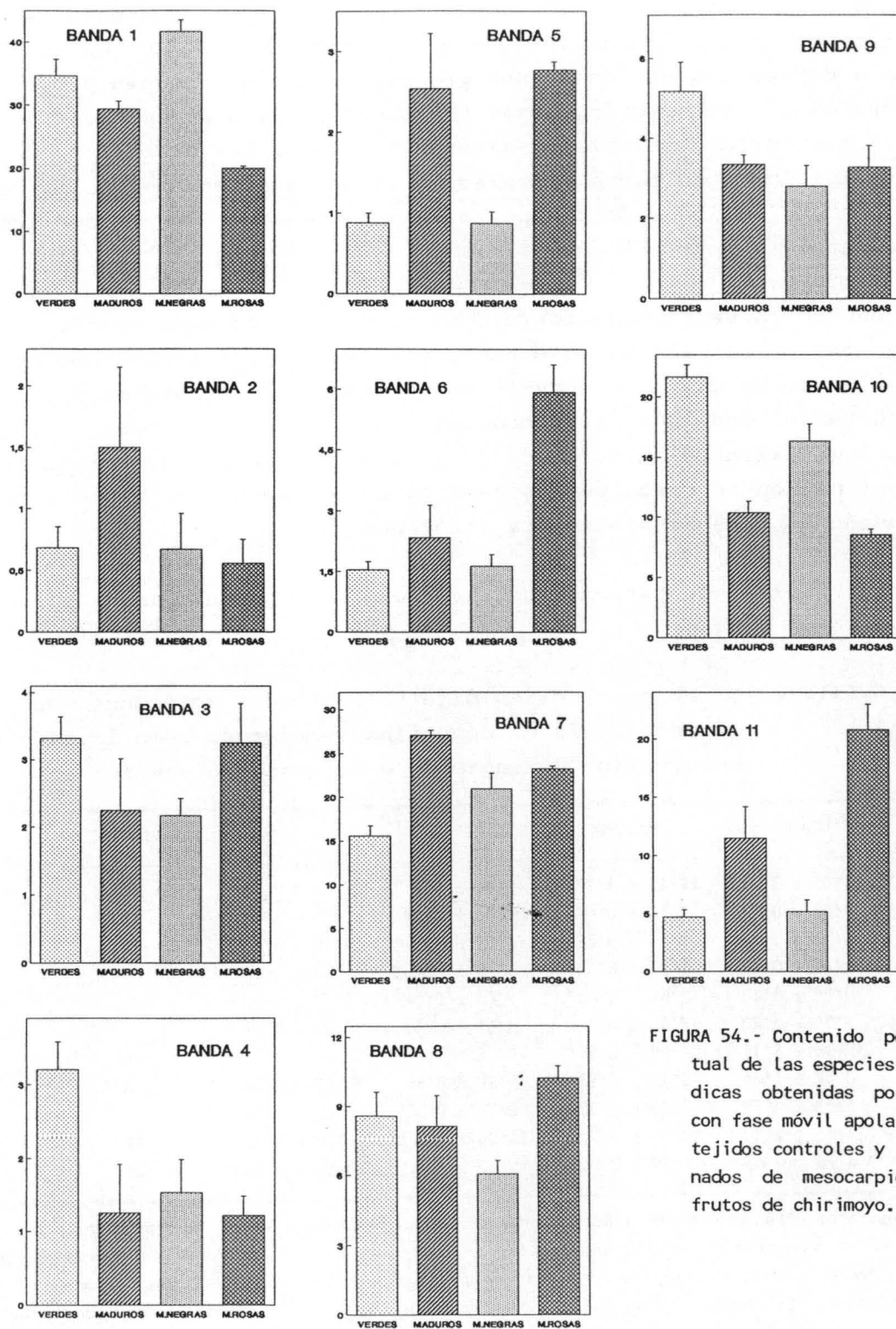


FIGURA 54.- Contenido porcentual de las especies lipídicas obtenidas por TLC con fase móvil apolar, en tejidos controles y lesionados de mesocarpio de frutos de chirimoyo.

bandas utilizando únicamente criterios de movilidad cromatográfica. Las bandas identificadas se señalan en la tabla XXIV.

Hemos comprobado que la banda 2 presenta la misma movilidad que los monoacilgliceroles, permaneciendo siempre muy próxima al origen. La banda 4 presenta la misma movilidad que el colesterol libre. Sin embargo, al proceder como con el resto de las bandas, a su saponificación y posterior metilación de sus ácidos grasos, presentaba una composición normal en AG, lo que hace que la descartemos como tal especie lipídica aislada, aunque es posible que migren conjuntamente esteroides libres y otros componentes lipídicos. La banda 5 frecuentemente desdoblada en dos muy finas y estrechas, pero que por su proximidad resultaba imposible separarlas, coincidía con el valor del R_f de los diacilgliceroles empleados como patrón. La banda 8 presenta la misma movilidad que los triacilgliceroles y las bandas 10 y 11 presentaban un R_f comparable al de esteroides esterificados. Además de la banda 1 correspondiente a la fracción de Fosfolípidos y la banda 7 correspondiente a la fracción de AG libres, previamente estudiadas durante la maduración.

Es curioso que, a pesar de presentar una gran disminución en el contenido de fósforo lipídico, las lesiones pardas tienen una elevada proporción de fosfolípidos. Este hecho induce a pensar que en estas zonas hay un metabolismo degradativo de lípidos muy acusado.

Los AG libres aumentan con la maduración y también es mayor su nivel en los tejidos lesionados que en los frutos verdes. La relación AGP/P es significativamente mayor en las lesiones rosadas al compararla con los frutos control, tanto verdes como maduros, mientras que las lesiones pardas muestran un valor semejante al de los controles verdes (Figura 55).

Las proporciones en que se encuentran las bandas 10 y 11 son opuestas, mientras que en los frutos verdes la banda 10 representa un 22% del total de las especies lipídicas. En los frutos con lesiones rosadas sólo alcanza un 9%, encontrándose proporciones inversas en la banda 11. Como hemos dicho anteriormente que ambas especies lipídicas podrían ser esteroides esterificados, hemos calculado las relaciones 10/P, 11/P y 10+11/P.

En la relación 10/P se observa un ligero descenso de los frutos maduros y lesiones frente a los frutos verdes, en la relación 11/P encontramos una evolución de signo contrario. Al considerar las

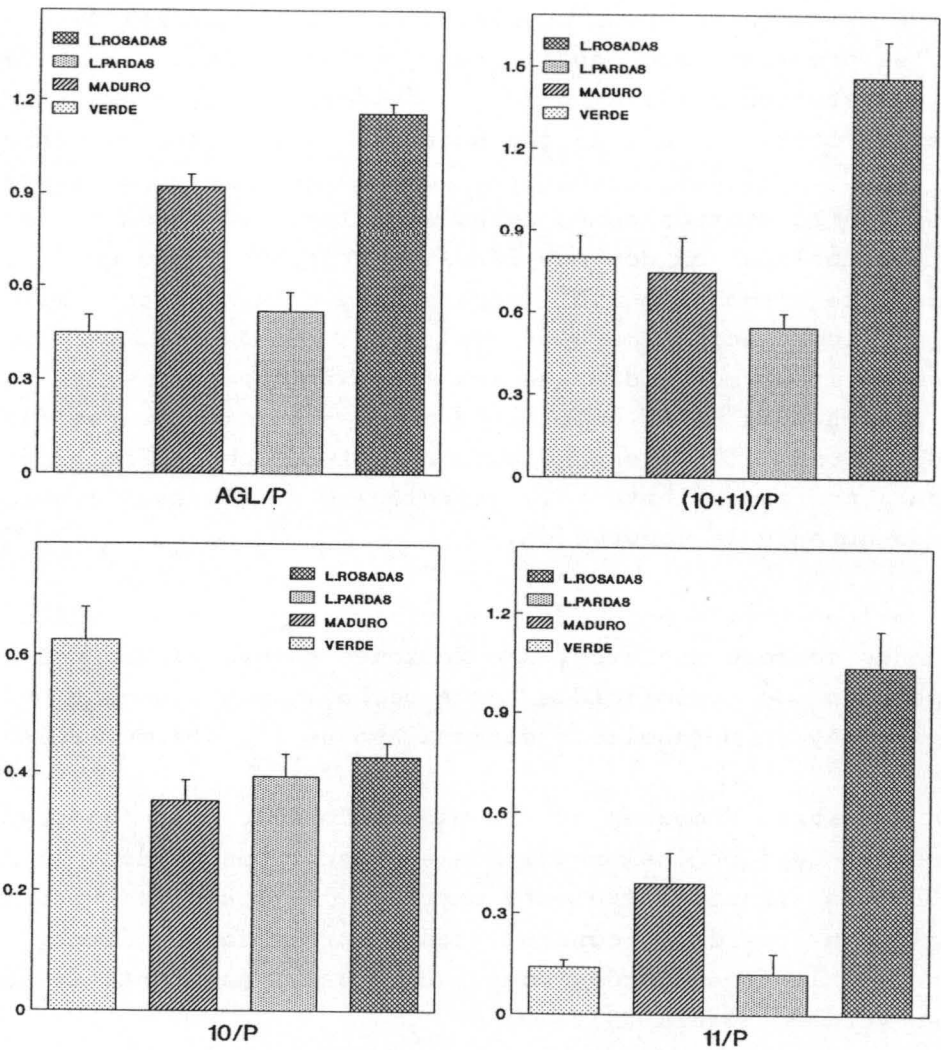


FIGURA 55.- Relación entre los contenidos de ácidos grasos libres y lípidos apolares con el contenido en fosfolípidos en tejidos controles y lesionados de mesocarpio de frutos de chirimoyo.

bandas 10 y 11 como si se tratara de una única especie lipídica o bien que siendo diferentes, representan la cantidad total de lípidos neutros contenidos en la muestra observamos, que la relación 10+11/P es significativamente mayor en los frutos maduros y más aún en las lesiones rosadas, lo que podría indicar que en este tejido sí ha habido degradación de los fosfolípidos constituyentes de las

membranas y se ha incrementado la proporción de esteroides esterificados o de lípidos neutros (Figura 55).

IV.4.2.1.2. ACIDOS GRASOS CONSTITUYENTES DE CADA BANDA.

Una vez separadas las bandas, analizamos la variación en la composición de los ácidos grasos en el tejido dañado con respecto a los controles. Para ello hemos realizado un estudio comparativo de los ácidos grasos componentes de las diferentes bandas analizadas.

En este caso hemos clasificado los ácidos grasos como :

AG saturados: C16, C17, C18, C20, C22
 AG monoinsaturados: C16:1, C17:1, C18:1, C20:1, C24:1
 AG de la serie W6: C18:2w6, C18:3w6, C20:3w6, C20:4w6,
 C22:3w6, C22:4w6.
 AG de la serie w3: C18:3w3, C18:4w3, C20:5w3, C22:6w3.

En todas las bandas analizadas el AG saturado mayoritario es invariablemente el ácido palmítico, seguido del esteárico. El ácido oléico representa el AG monoinsaturado más abundante y el ácido linoléico es el que se encuentra en mayor proporción dentro de los ácidos dienólicos de la serie w6.

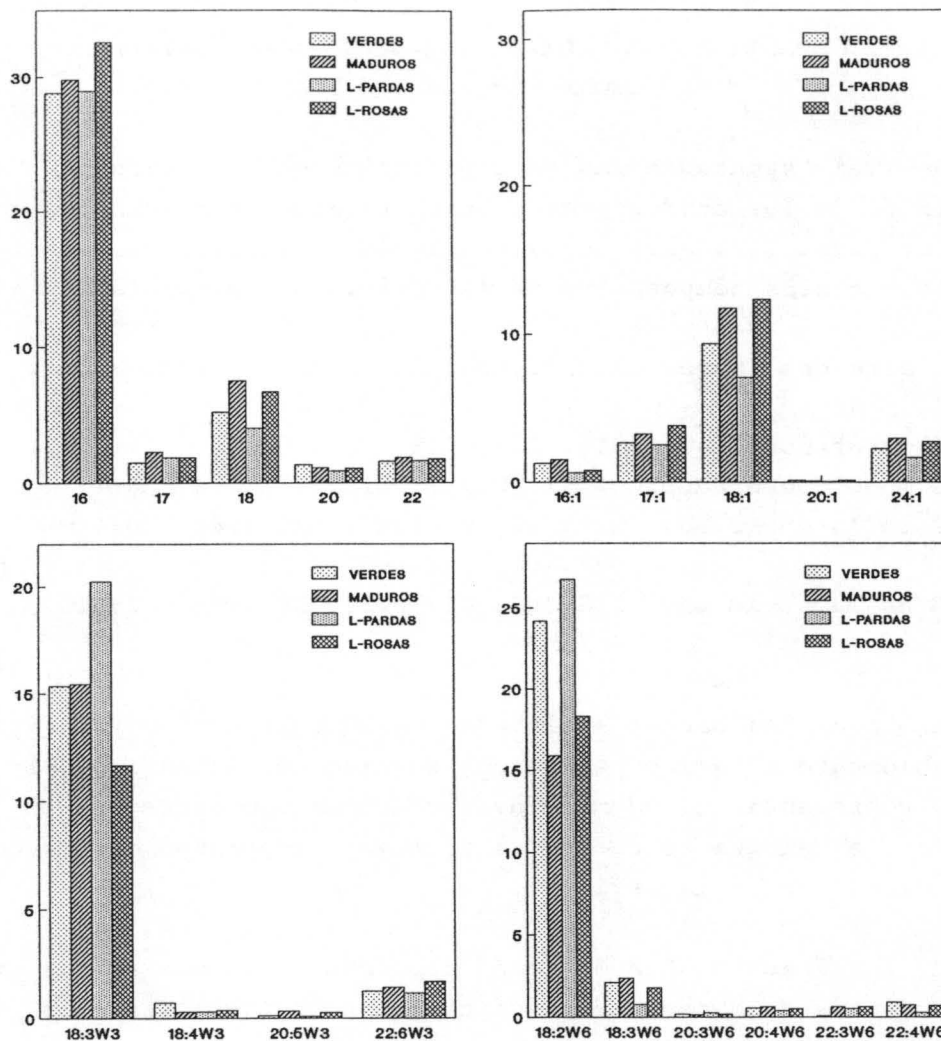
En las Figuras 56 a 66 están representados los ácidos grasos constituyentes de cada banda, así como los índices lipídicos considerados.

BANDA 1

No se produce un recambio aparente en la composición de los AG de los fosfolípidos en las condiciones estudiadas. Las lesiones pardas muestran una ligera disminución de los AG monoinsaturados especialmente de C18:1, a la vez que mantienen altos porcentajes de C18:2w6 y C18:3w3, este comportamiento es el responsable de las diferencias encontradas en los índices lipídicos analizados.

BANDA 2

Ha sido identificada como la fracción correspondiente a los



monoacilgliceroles. Su abundancia es notablemente mayor en los frutos maduros, sin que se obtengan diferencias significativas con respecto al resto de las condiciones por la dispersión de los resultados.

Al analizar individualmente el contenido de los AG saturados, AG monoinsaturados, AG de la serie w3 y AG de la serie w6, constituyentes de la banda 2, se observa un espectacular aumento en los porcentajes de los ácidos palmítico, linoléico y linolénico para los frutos maduros. El alto porcentaje de C18:3w3 encontrado en los frutos maduros, se reparte en las lesiones rosadas entre el C18:3W3 y C18:4w3.

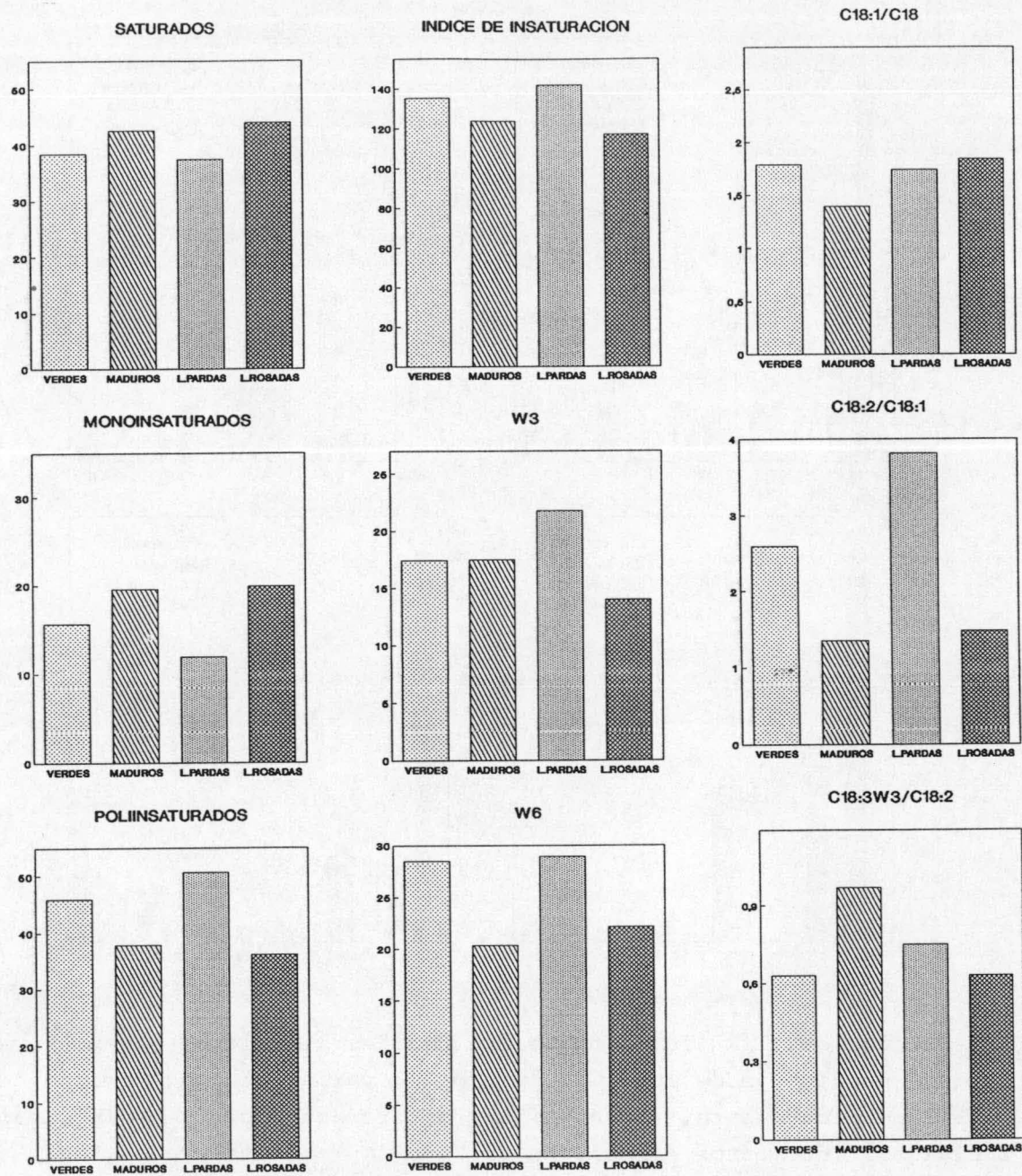
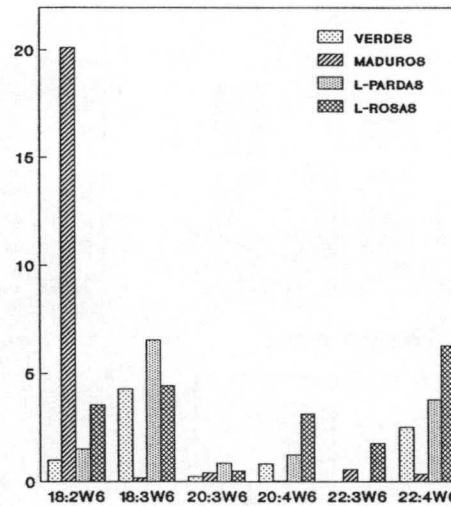
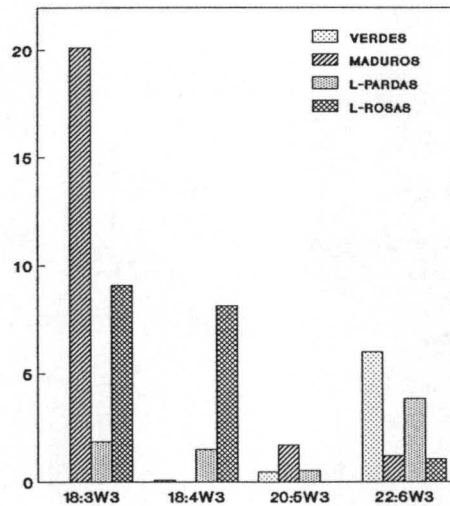
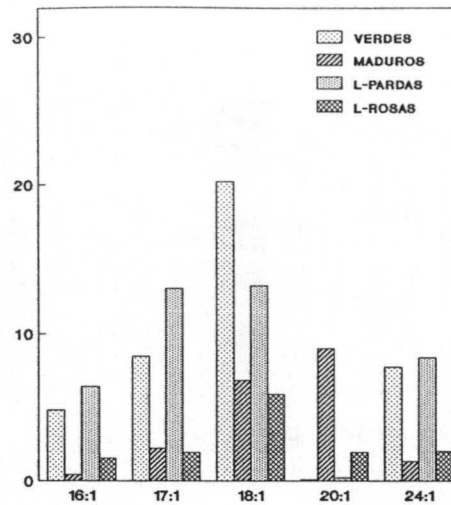
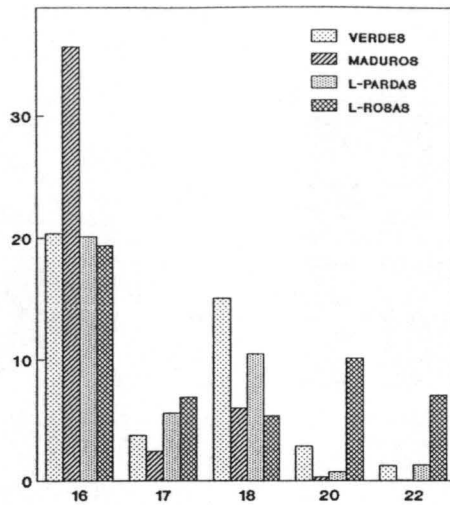


FIGURA 56.- Banda 1. Identificada como la fracción correspondiente a los fosfolípidos. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 1, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Al expresar la evolución de los índices lípidicos, podemos ver que el porcentaje de los AG Saturados no varía sustancialmente de una condición a otra, aunque sí hay diferencias en la composición individual de estos ácidos. En el % de AG Monoinsaturados, sí se observan variaciones importantes, resultando niveles muy bajos en los frutos maduros y en las lesiones rosadas, mientras que el % de AG Poliinsaturados está muy elevado, lo que queda confirmado al observar los índices W3 y W6 en ambas condiciones.

El incremento que experimenta el índice C18:2/C18:1 en los frutos maduros elevándose en un 600% con respecto a los frutos verdes, es consecuencia no sólo de la subida del C18:2w6 sino

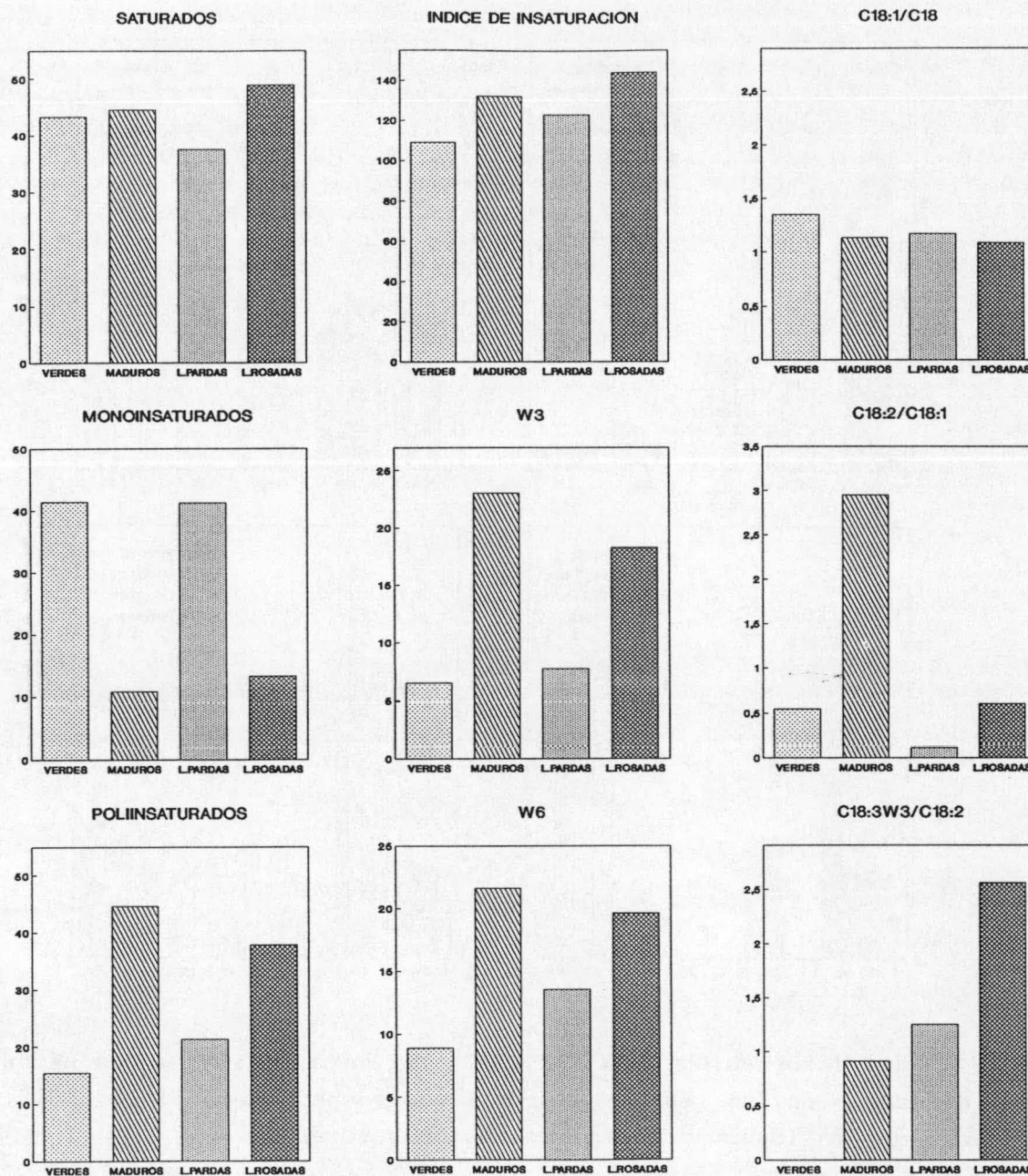
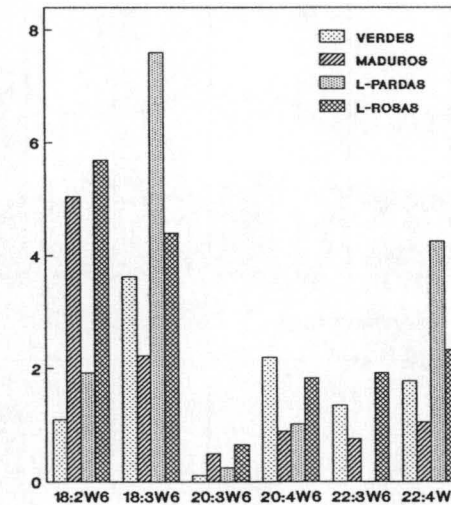
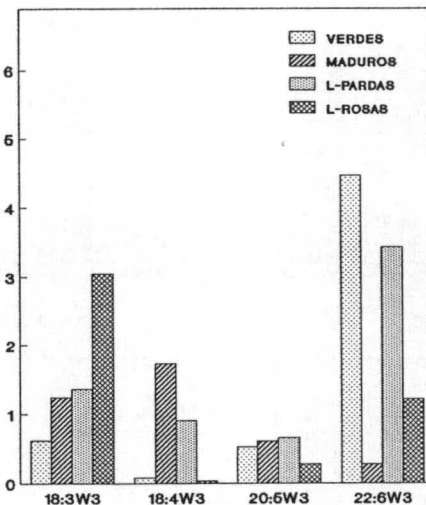
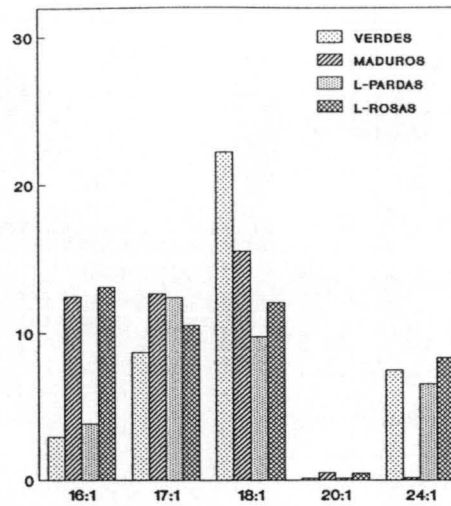
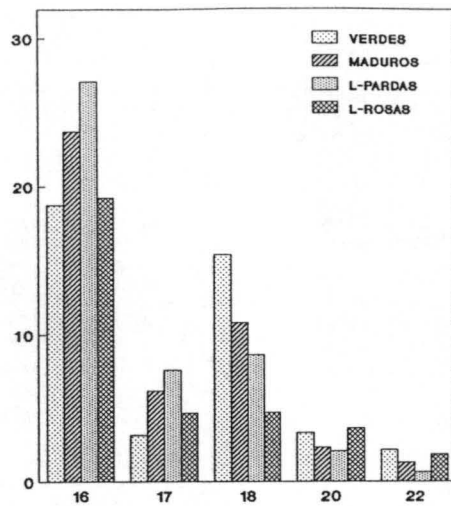


FIGURA 57.- Banda 2. Identificada como la fracción correspondiente a los monoacilglicerolos. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 2, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



también del descenso sufrido por el C18:1. Este índice se encuentra muy disminuido en las lesiones pardas. Con respecto al C18:3w3/C18:2 alcanza máxima importancia en las lesiones rosadas.

BANDA 3

Esta banda es más abundante en los frutos verdes y en las lesiones rosadas. El estudio de los índices lipídicos, muestra una evolución semejante para los frutos verdes y maduros, mientras que en ambos tipos de lesiones se produce un ligero incremento en el % de AG Poliinsaturados, como se justifica por los aumentos que experimentan también los índices W3 y W6. Del análisis individual de los

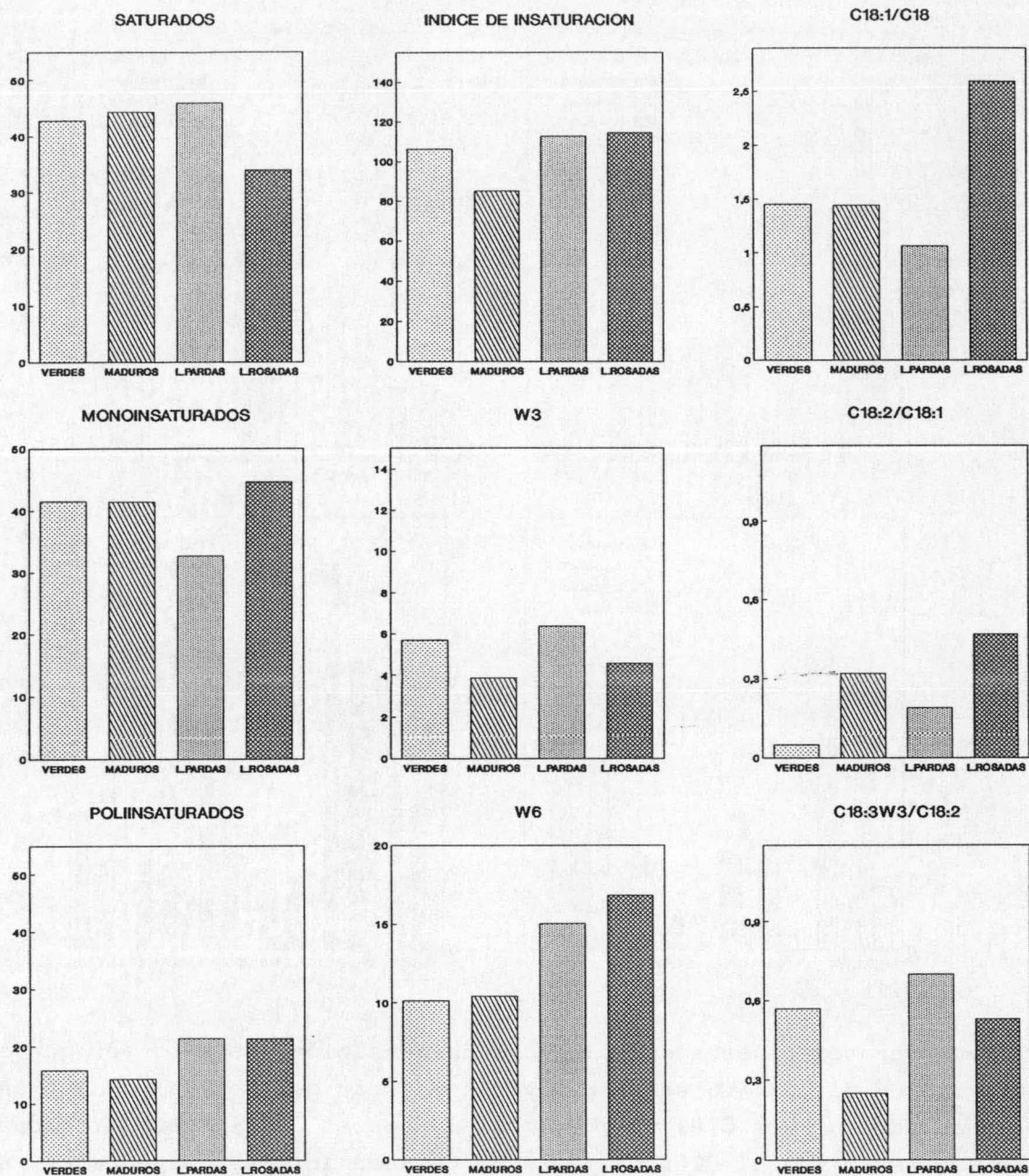
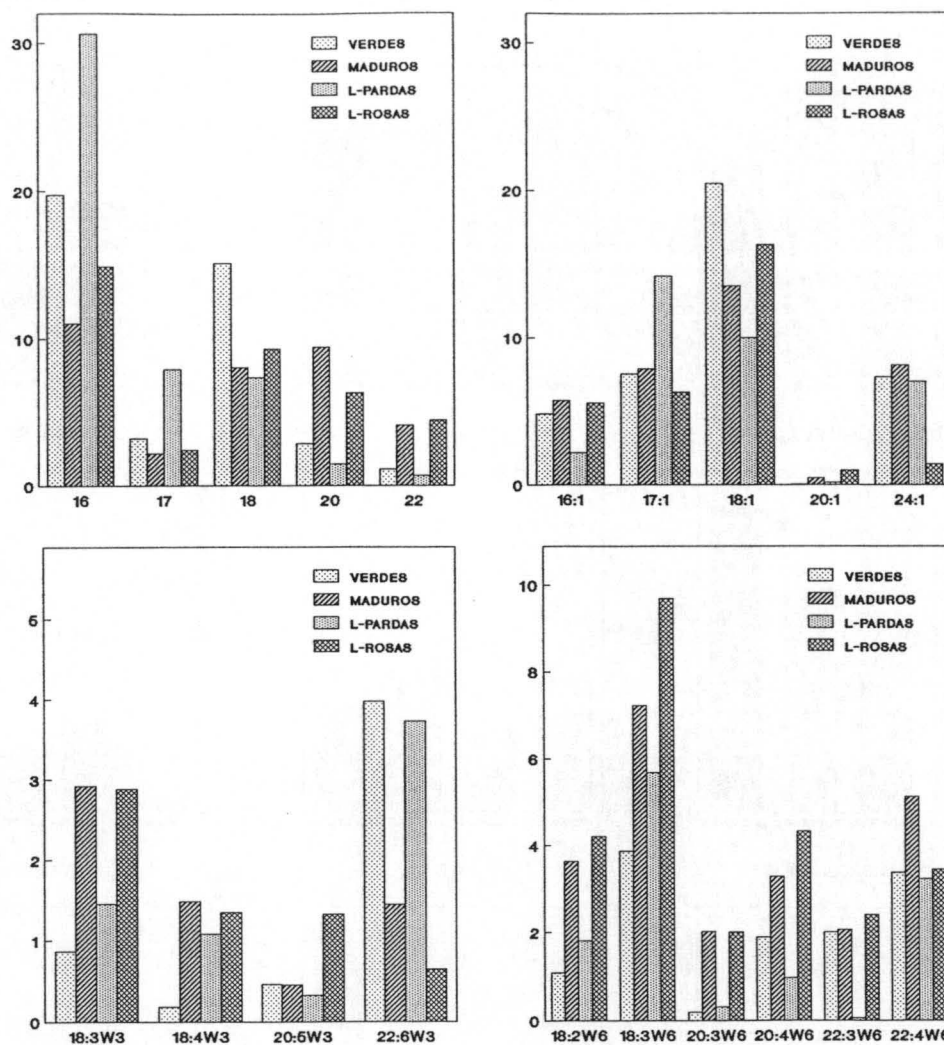


FIGURA 58.- Banda 3. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 3, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



AG componentes de esta especie en cada condición, podemos ver que el C18:3w6 y el C22:4w6 son los mayoritarios de esta serie en las lesiones pardas y el C18:2w6 y C18:3w6 lo son en las lesiones rosadas. De la serie w3, el C18:3w3 y el C22:6w3 son los más abundantes en las lesiones rosadas y pardas respectivamente. Los índices C18:1/18 y C18:2/C18:1 son más altos en las lesiones rosadas, pero este último presenta una pequeña diferencia con respecto a los controles maduros, por último el C18:3/C18:2 es más bajo en los frutos maduros.

BANDA 4

La abundancia de esta banda es mayor en los frutos verdes,

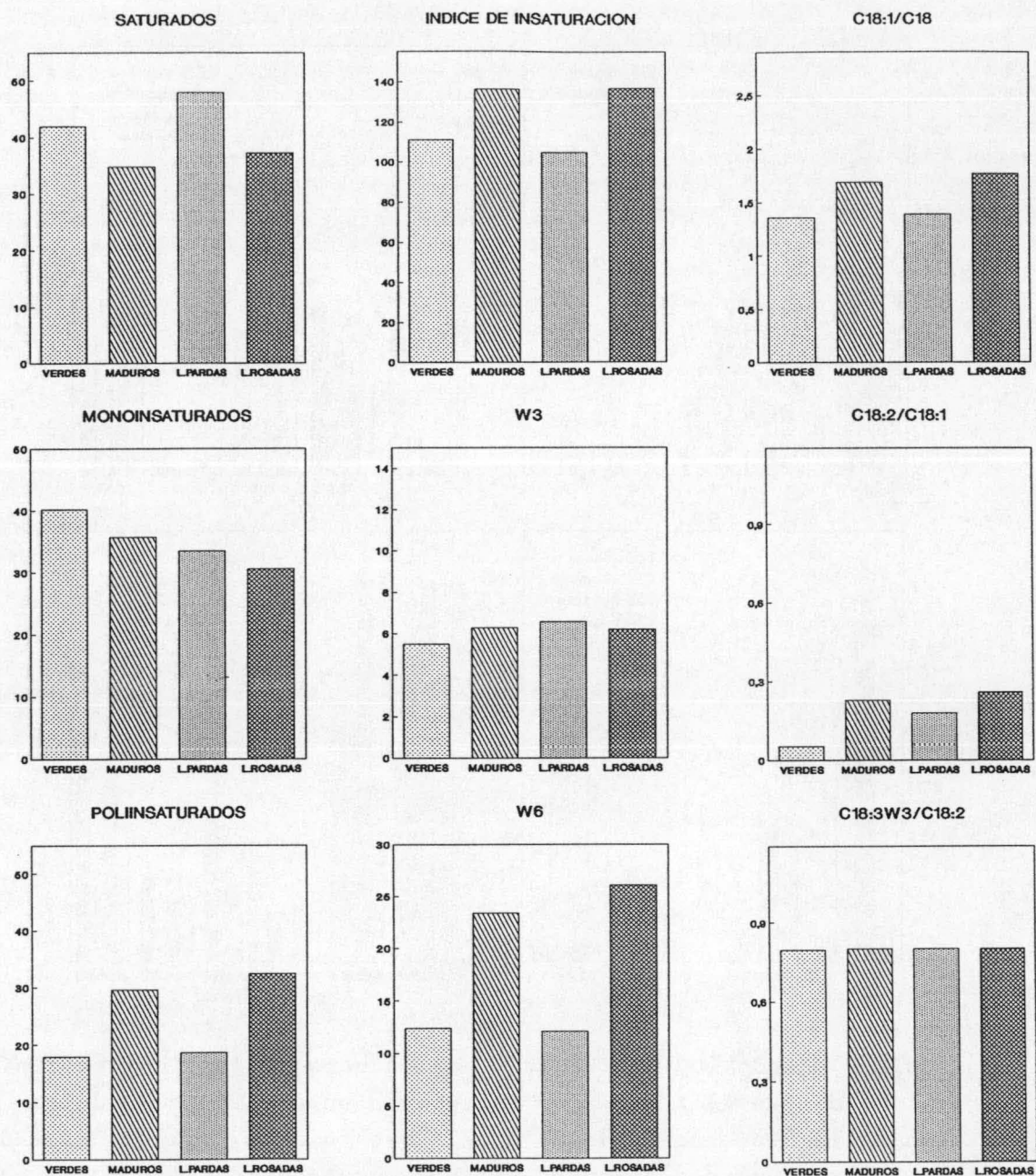
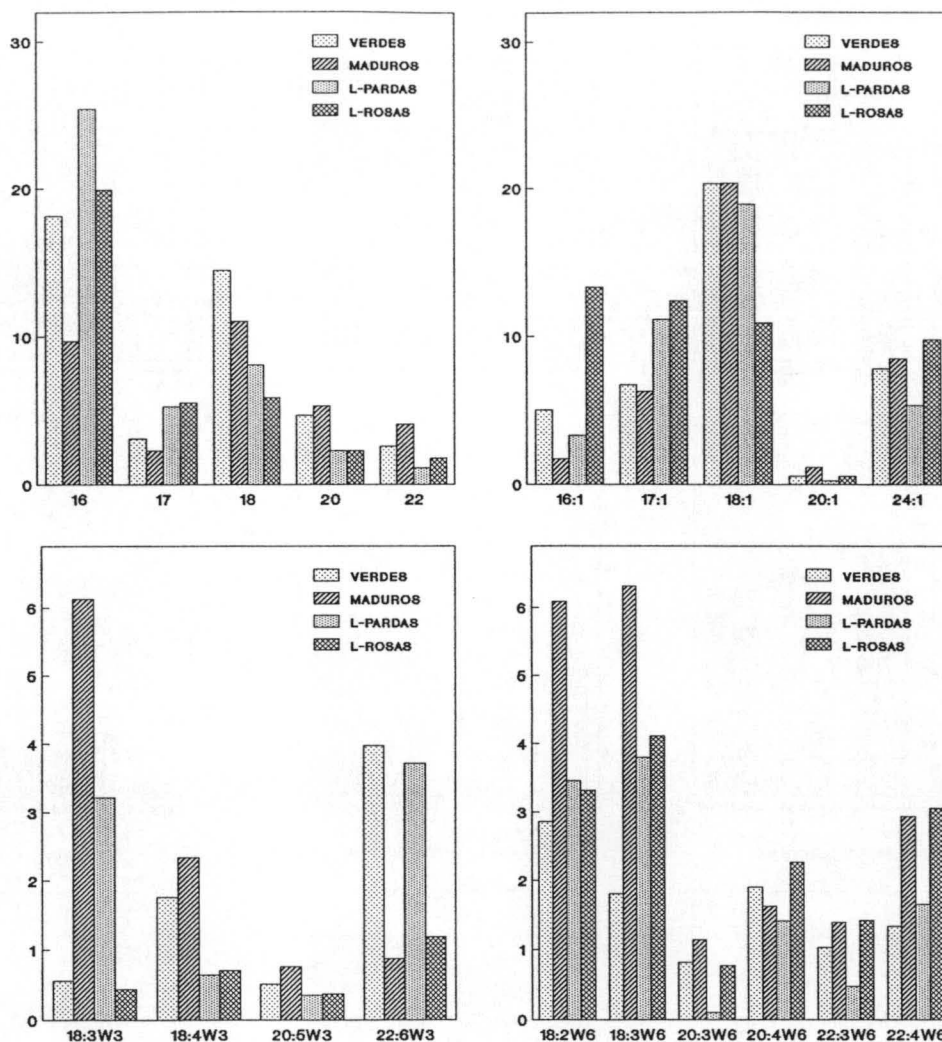


FIGURA 59.- Banda 4. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 4, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



aunque sigue siendo muy minoritaria. El estudio de los índices lipídicos, indica que el % de W6 se incrementa en los frutos maduros y más aún en la lesiones rosadas, por lo que también resulta elevado el % de Poliinsaturados en estos tejidos, aunque todos los AG componentes de esta serie muestran un valor superior al encontrado en los frutos verdes, es el C18:3w6 el más abundante.

BANDA 5

La especie lipídica correspondiente a esta banda, presenta la misma movilidad que los diacilgliceroles empleados como patrón. Es más abundante en los frutos maduros y en las lesiones rosadas.

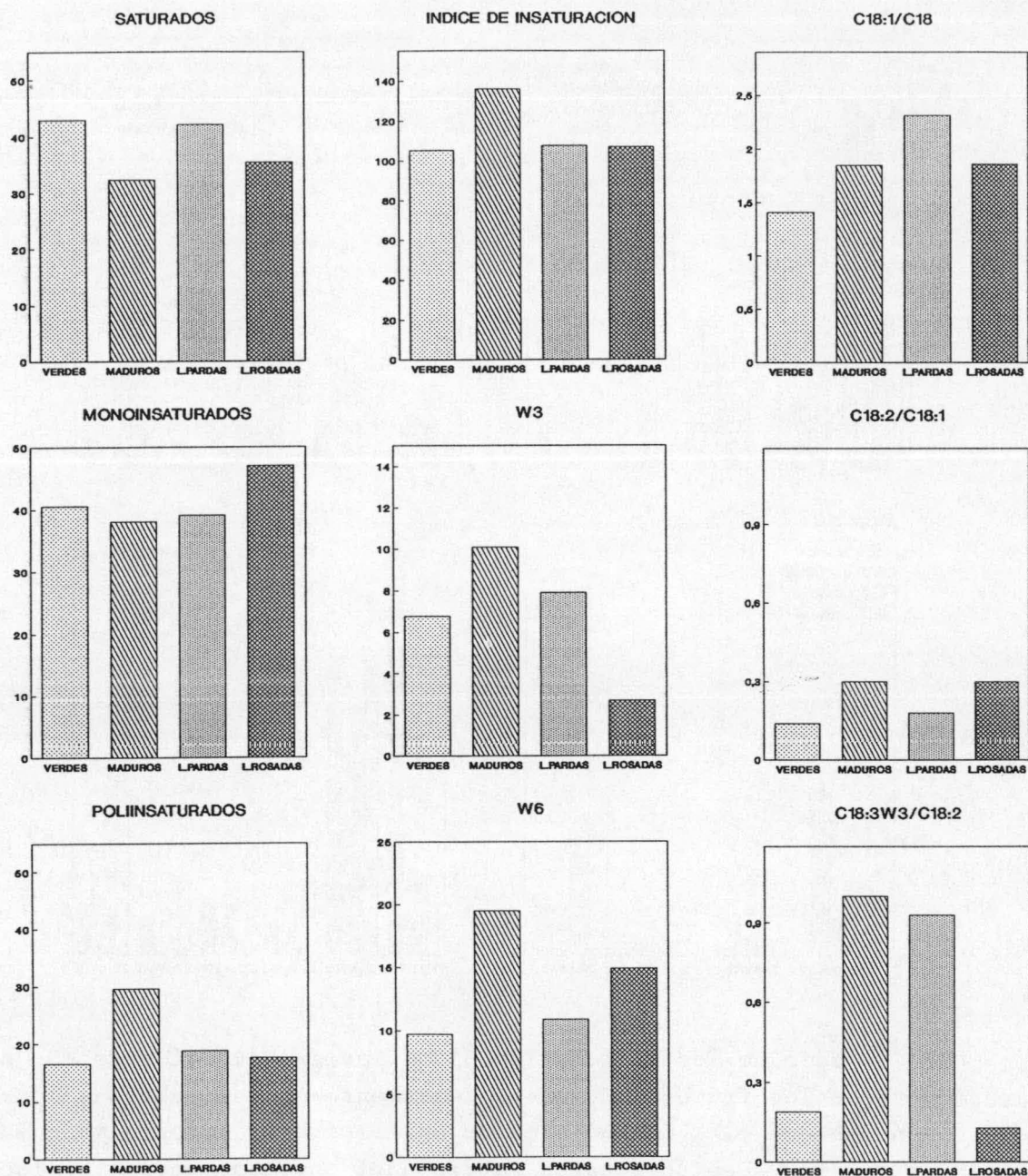
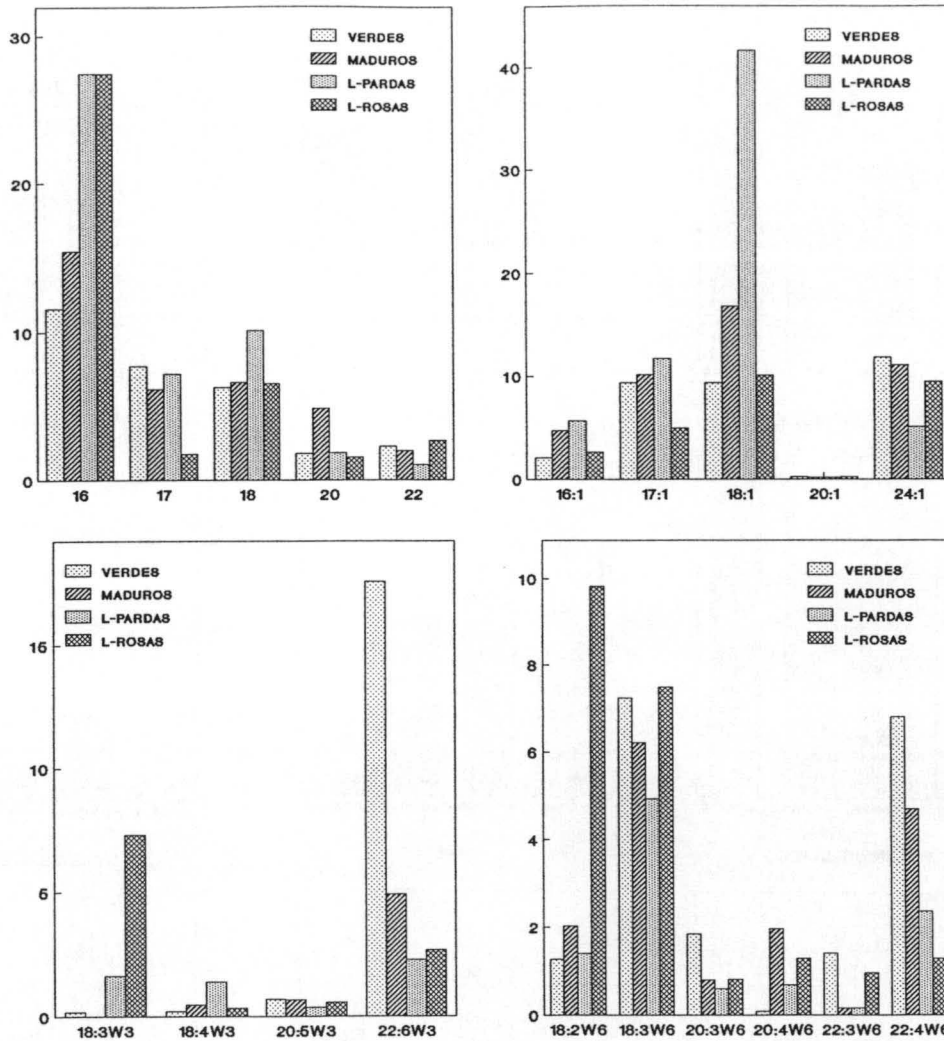


FIGURA 60.- Banda 5. Identificada como la fracción de Diacilgliceroles. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 5, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



El estudio de los índices lipídicos indica, que el % de W3 se incrementa en los frutos maduros y ligeramente en las lesiones pardas, mientras que el % de W6 es mayor en los frutos maduros y en las lesiones rosadas. Debido a estas variaciones opuestas en los tejidos dañados, el índice de Poliinsaturados sólo aparece incrementado en los frutos maduros. Al analizar la composición individual de los ácidos componentes de estas series, vemos que son los ácidos C18:2w6, C18:3w6 y C18:3w3 los responsables de este incremento en los frutos maduros. Así mismo, el alto valor registrado en la relación C18:3w3/C18:2w6 en frutos maduros y lesiones pardas es consecuencia del mayor porcentaje de C18:3w3 registrado en estos tejidos frente al encontrado en los frutos verdes.

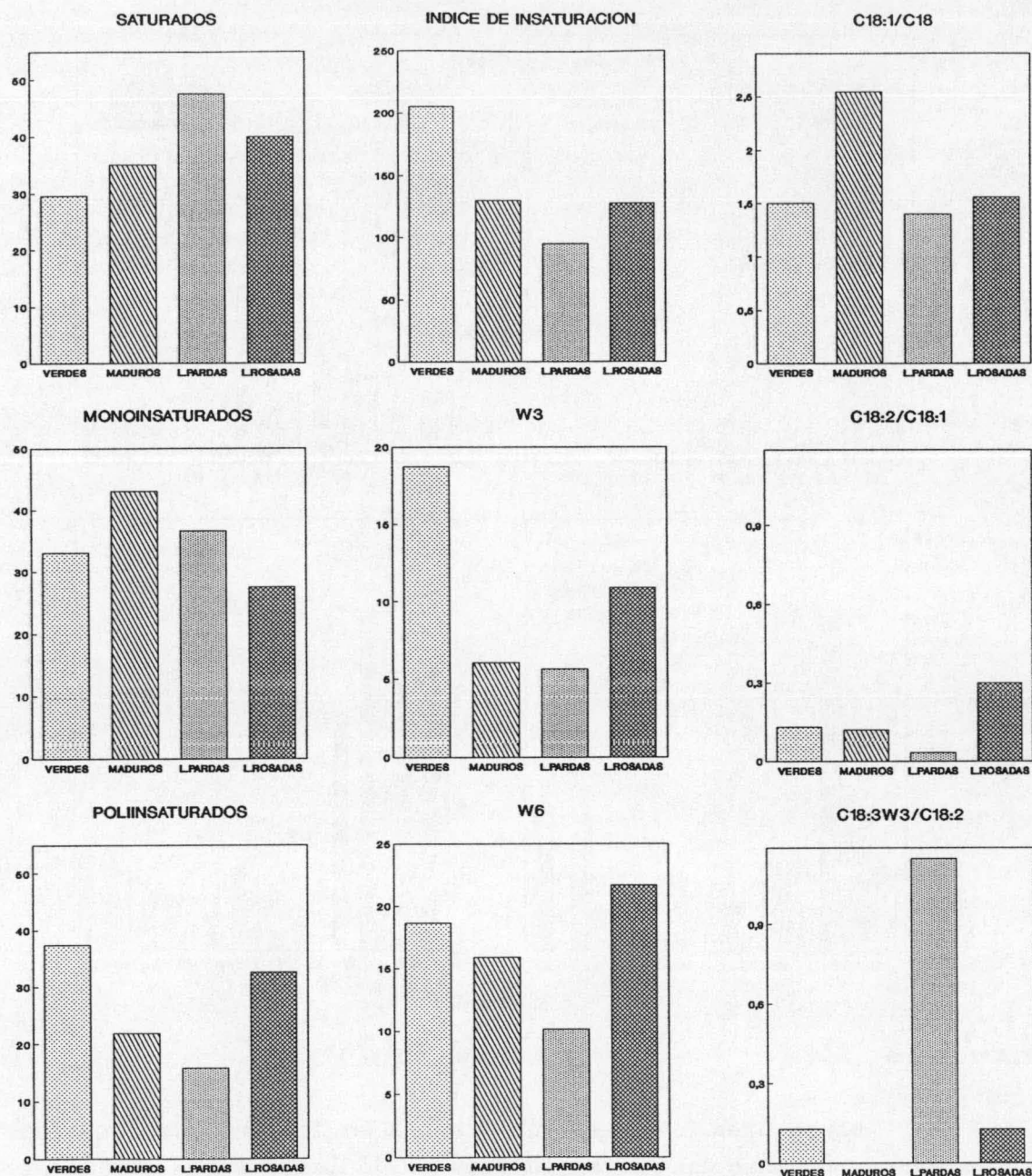
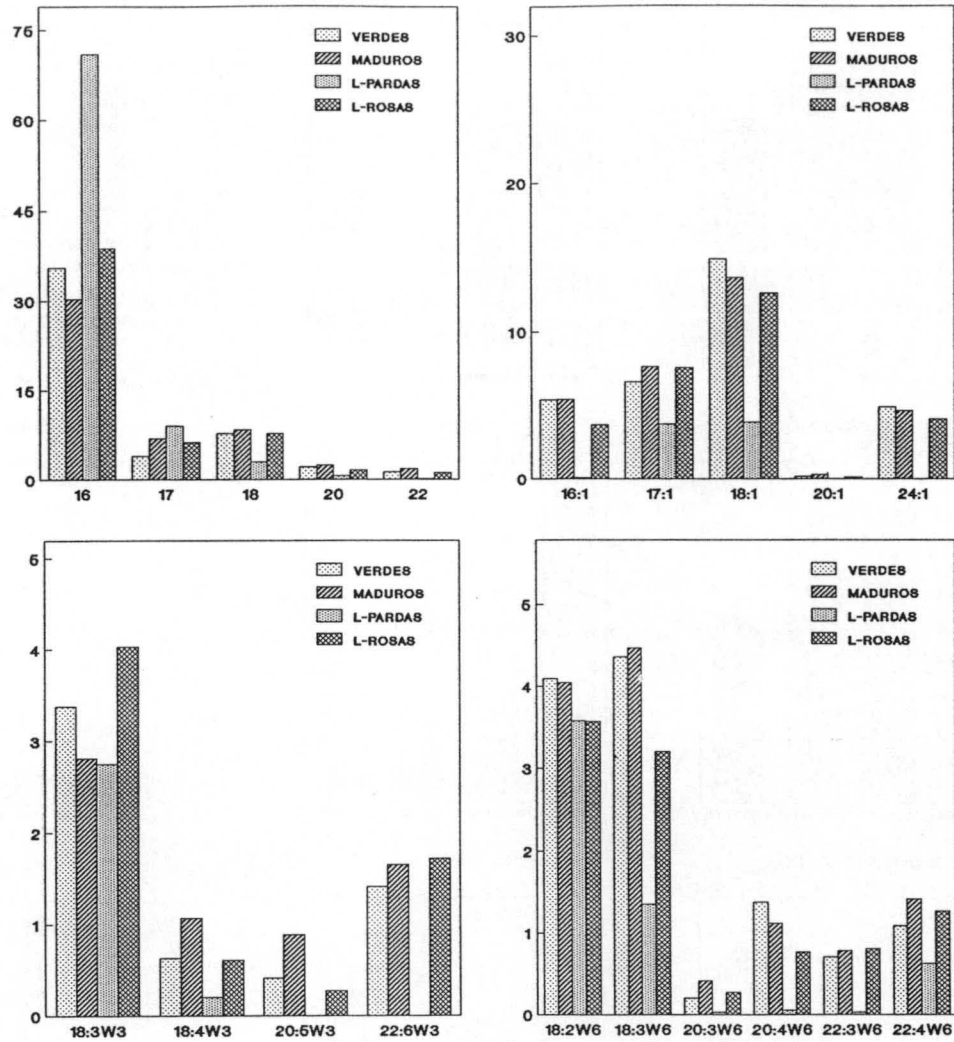


FIGURA 61.- Banda 6. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 6, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



BANDA 6

Esta banda presenta mayor abundancia en las lesiones rosadas. El análisis de la composición individual de los ácidos componentes de esta especie muestra que los porcentajes de ácido palmítico en los tejidos dañados se encuentran incrementados en un 200% con respecto a los controles verdes, siendo el ácido oléico también extraordinariamente importante en las lesiones pardas. La abundancia del C22:6w3 en los frutos verdes a pesar de que el resto de los componentes de esta serie están ausentes o participan en escasa proporción hace que los controles verdes presenten un índice de insaturación tan elevado, al igual que sucede con el % de W3 y el índice de

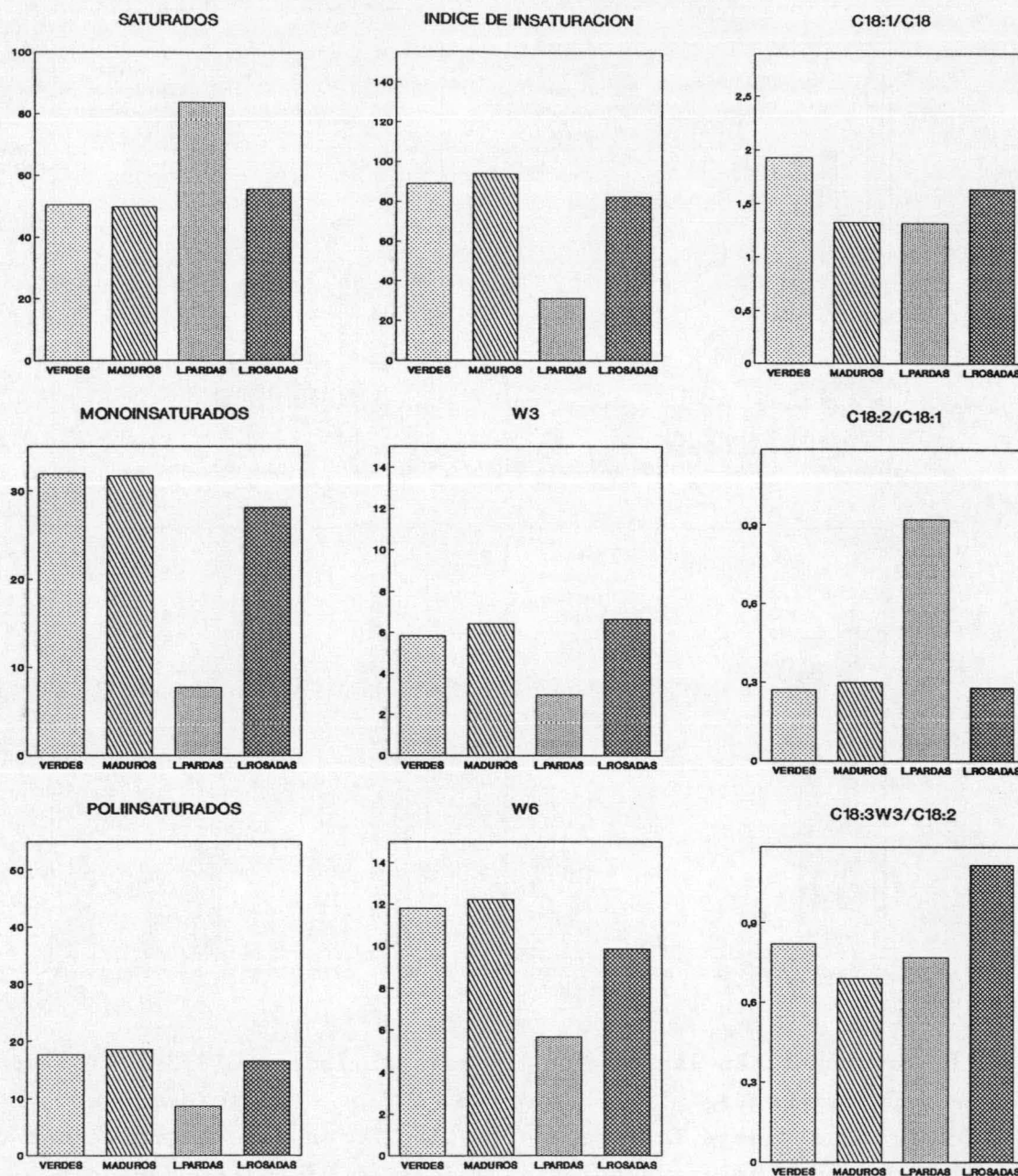
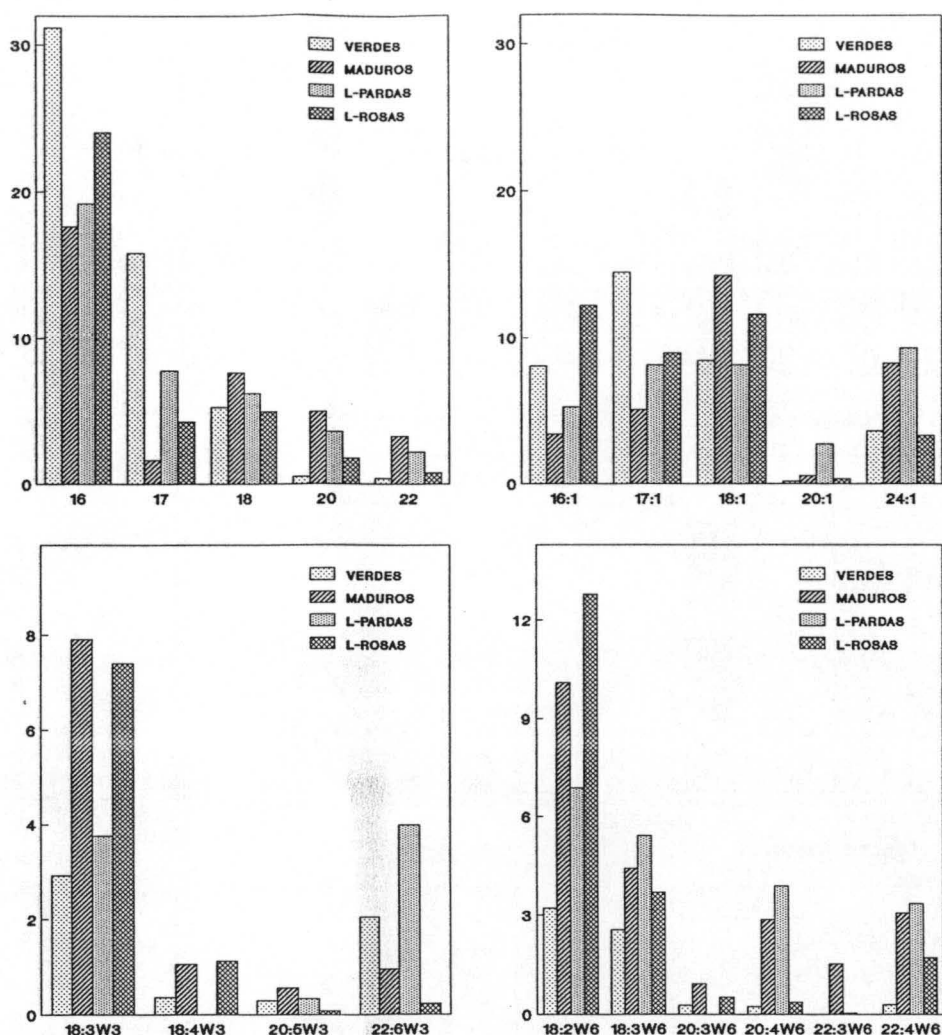


FIGURA 62.- Banda 7. Identificada como la fracción de ácidos grasos libres. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica n° 7, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Poliinsaturados. En las lesiones pardas el índice C18:3w3/C18:2w6 es extraordinariamente alto comparado con los controles, pero esta diferencia se debe a la ausencia de C18:3w3 en los controles más que a la abundancia relativa de estos ácidos en el tejido dañado.

BANDA 7

Esta banda ha sido identificada como la fracción correspondiente a los AG libres. Su abundancia es mayor en los frutos maduros y en las lesiones rosadas. El perfil que presentan los frutos control y las lesiones rosadas es semejante como puede apreciarse al comparar los valores de los índices lipídicos calculados. El % de

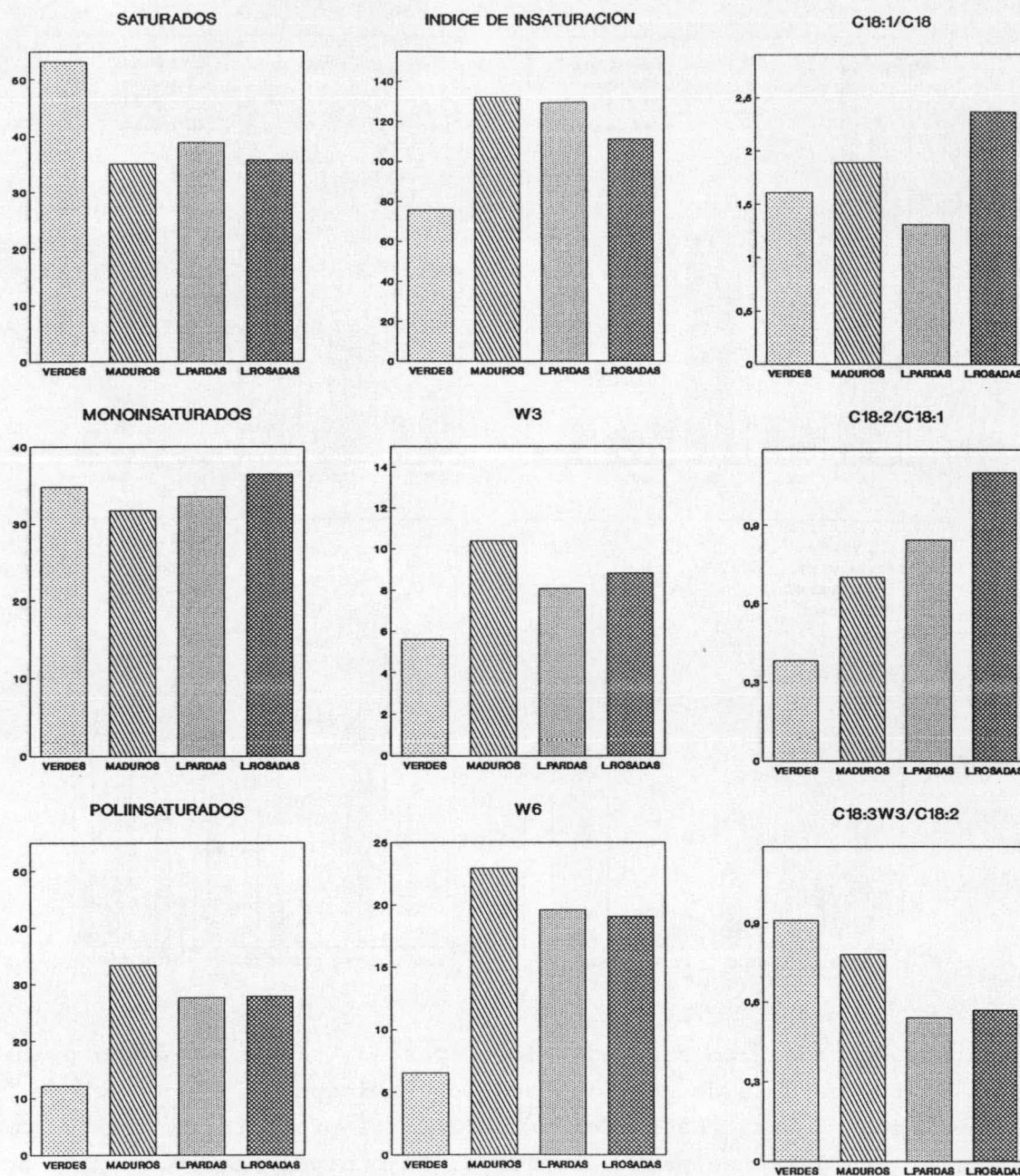
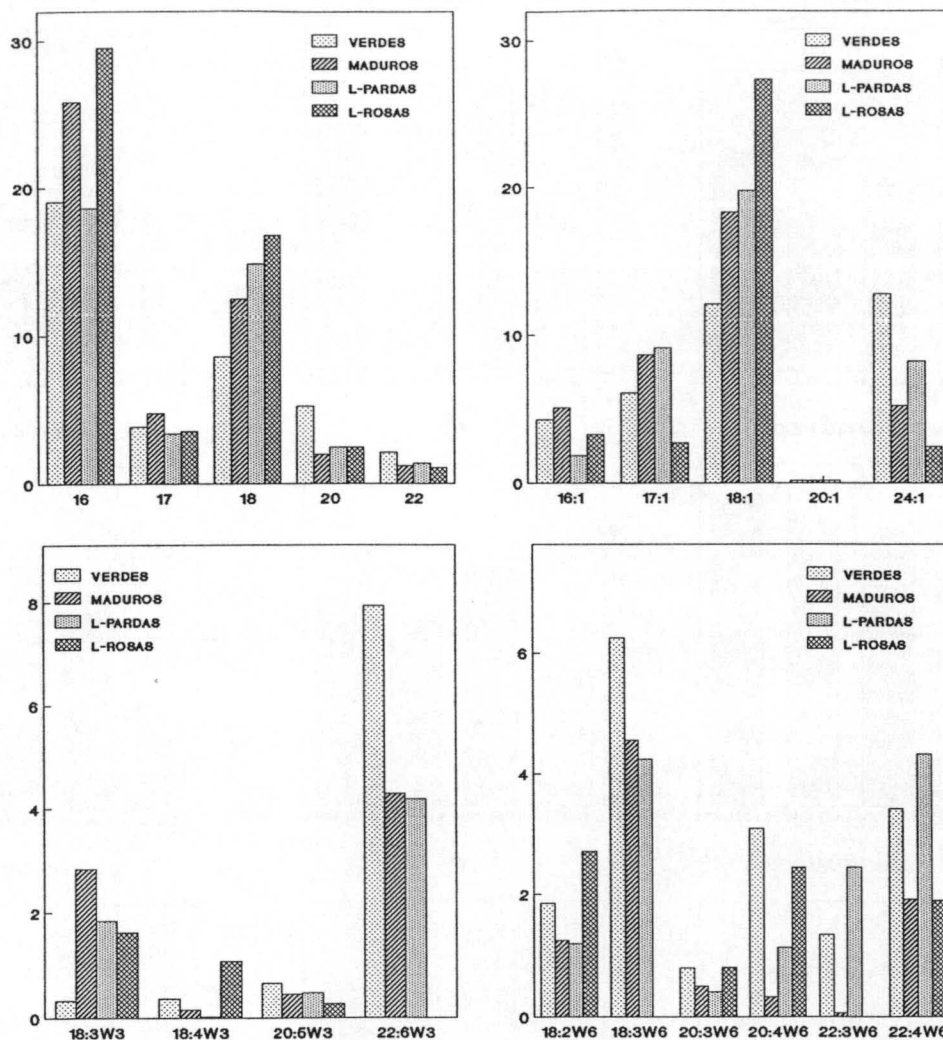


FIGURA 63.- Banda 8. Identificada como la fracción de triacilgliceroles. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 8, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Saturados es muy alto en las lesiones pardas, siendo el ácido palmítico el responsable de este incremento participando con un 70% de la composición total. La relación C18:2/C18:1 presenta un valor muy alto en las lesiones pardas debido al bajo nivel de C18:1 muy por debajo de los porcentajes encontrados en la otras condiciones.

BANDA 8

Presenta la misma movilidad que los Triacilgliceroles empleados como patrón. Se detecta menor abundancia de esta banda en las lesiones pardas. Del estudio de los índices lipídicos, destaca la evolución del % de Poliinsaturados en los frutos maduros y en el tejido

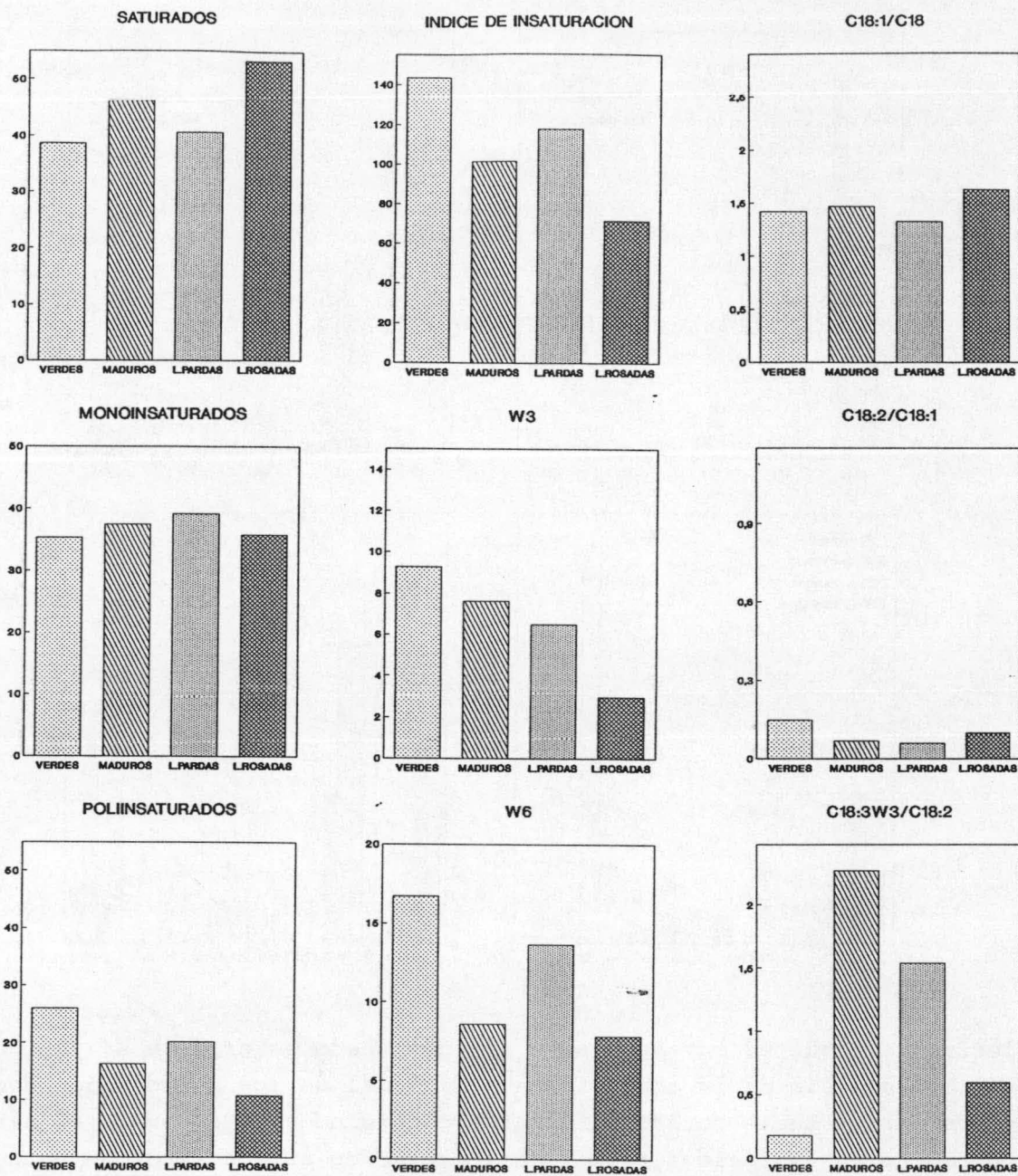
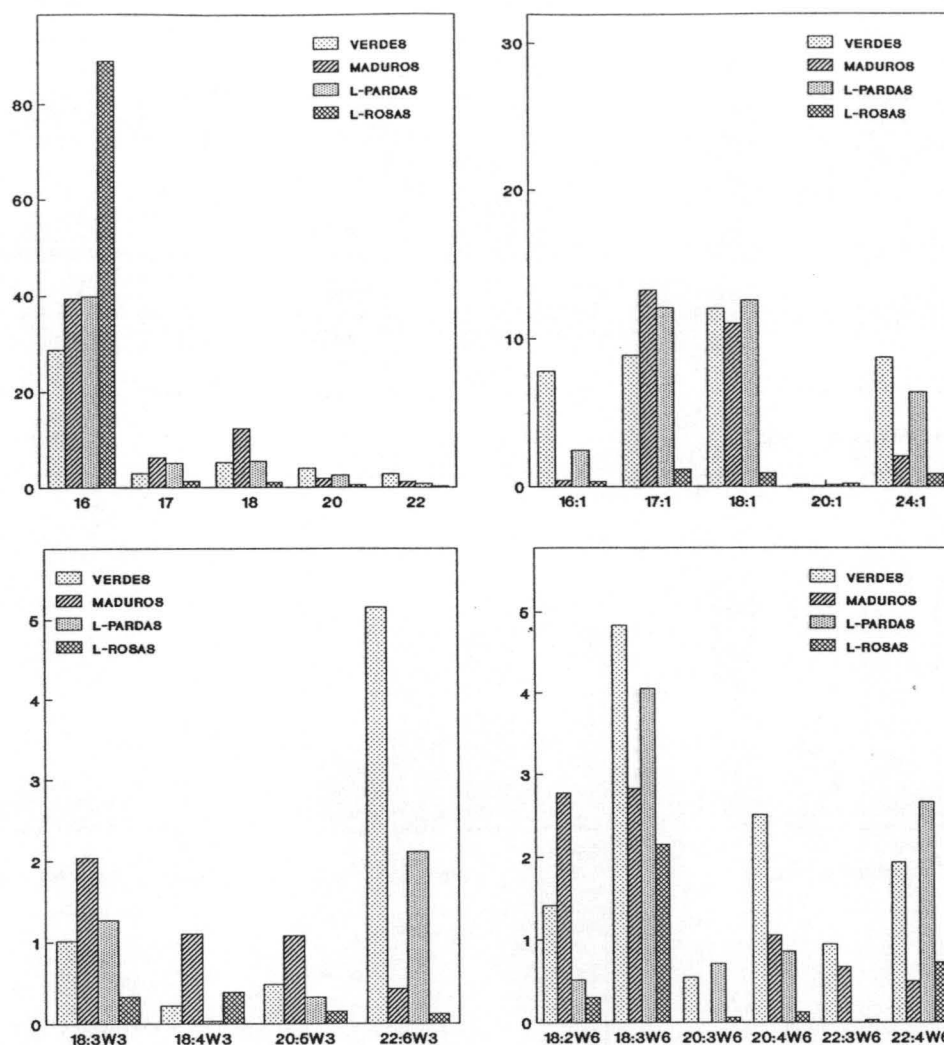


FIGURA 64.- Banda 9. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 9, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



lesionado, que es muy semejante al encontrado en el % de W3 y % de W6. El análisis de la composición individual de los ácidos que componen esta especie en las diferentes condiciones, nos revela el alto contenido en los ácidos palmítico y margárico en los frutos verdes así como la escasísima participación de los ácidos grasos poliinsaturados representados tan sólo por el C18:2w6 y el C18:3w6 que además están en un porcentaje muy bajo. El alto porcentaje de C18:2w6 presente en las lesiones rosadas es la causa de los valores encontrados para los índices C18:2/C18:1 y C18:3/C18:2.

BANDA 9

Esta especie, que no ha podido identificarse presenta mayor

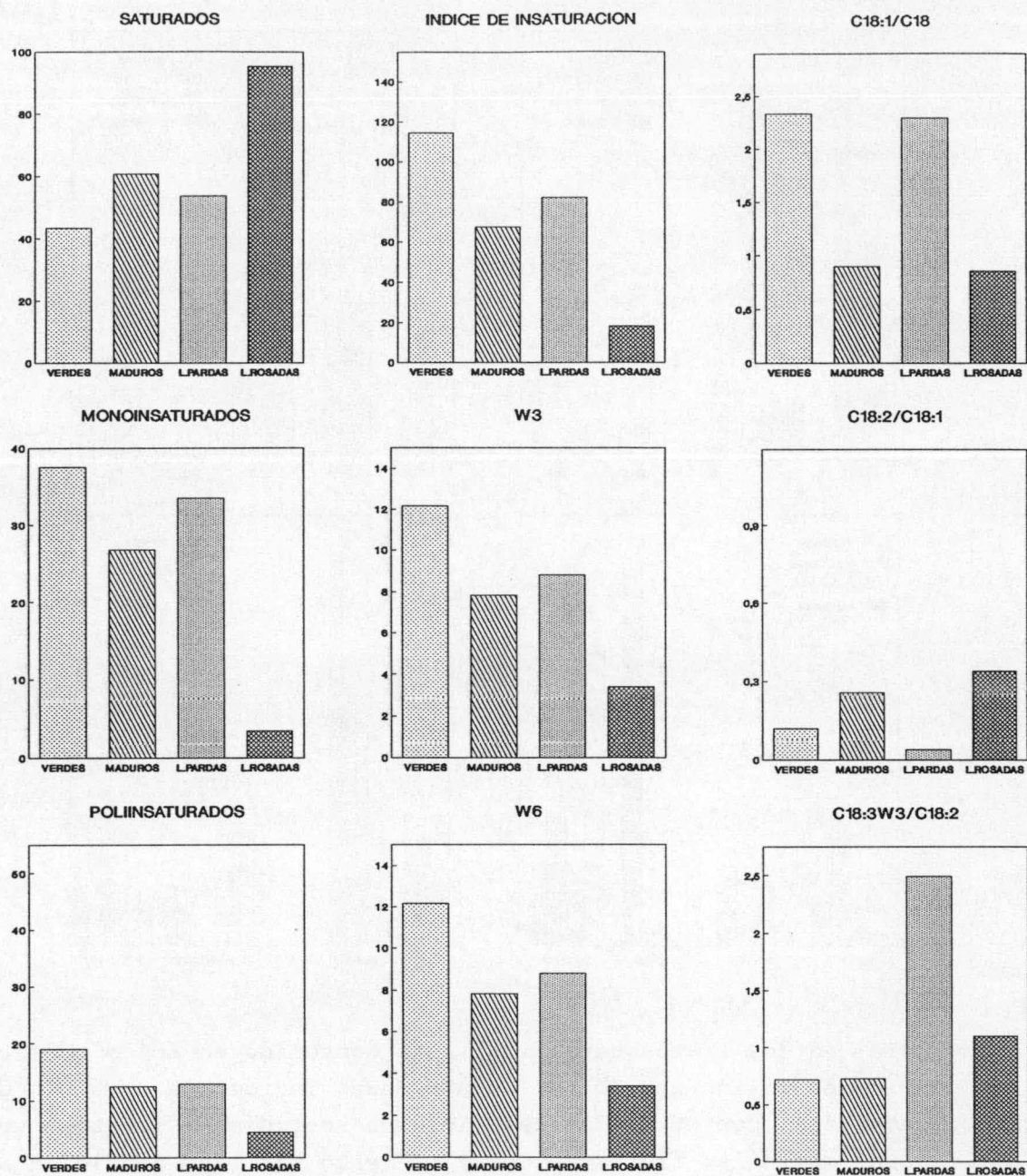
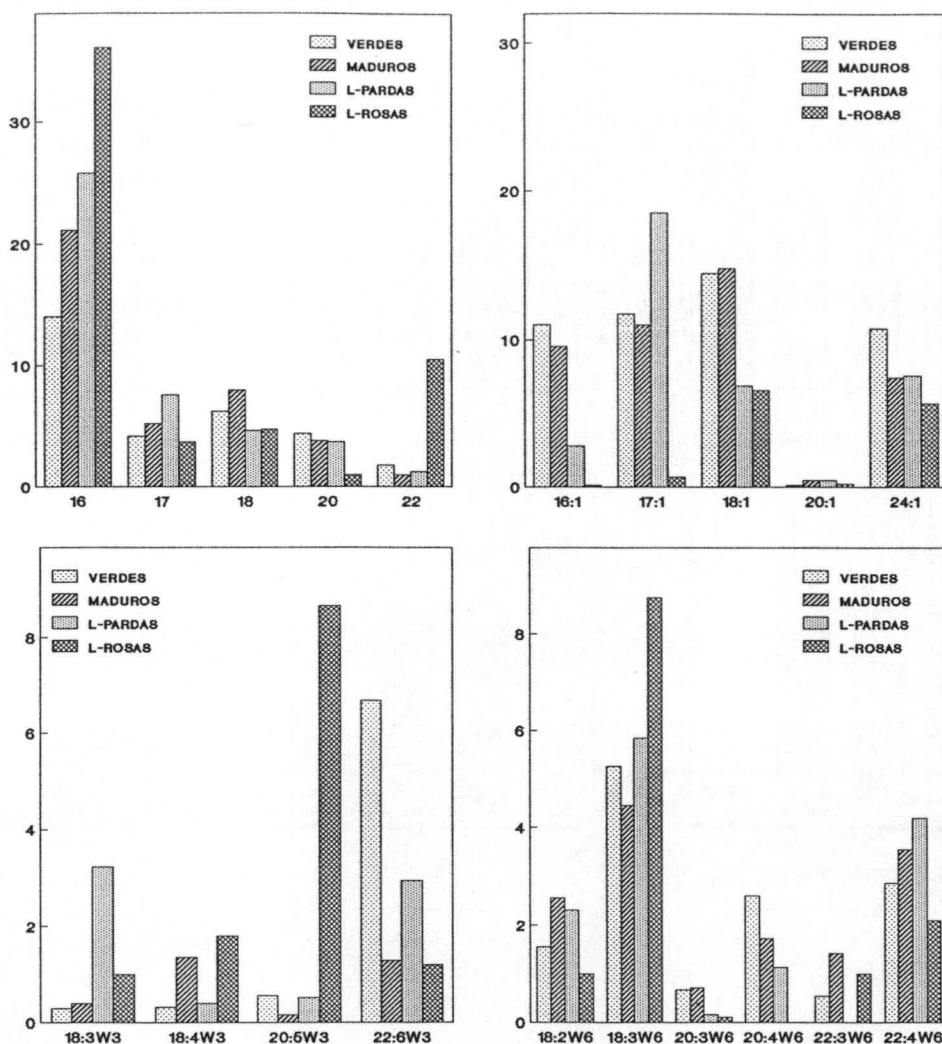


FIGURA 65.- Banda 10. Identificada como una fracción de esteroides esterificados. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 10, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



abundancia en los frutos verdes. El alto contenido en ácido oléico presente en el tejido rosado, no tiene apenas incidencia en el % de Monoinsaturados. Los otros índices lipídicos estudiados muestran una diferencia entre los frutos verdes y el resto de las condiciones. Esta diferencia viene marcada por el alto contenido de ácidos poliinsaturados en los frutos verdes. Al igual que en la banda 6 el porcentaje de C22:6w3 es muy alto. Tanto en los frutos maduros como en los tejidos lesionados destaca el alto valor del índice C18:3/-C18:2.

BANDA 10

Esta banda es más abundante en los frutos verdes, pensamos que

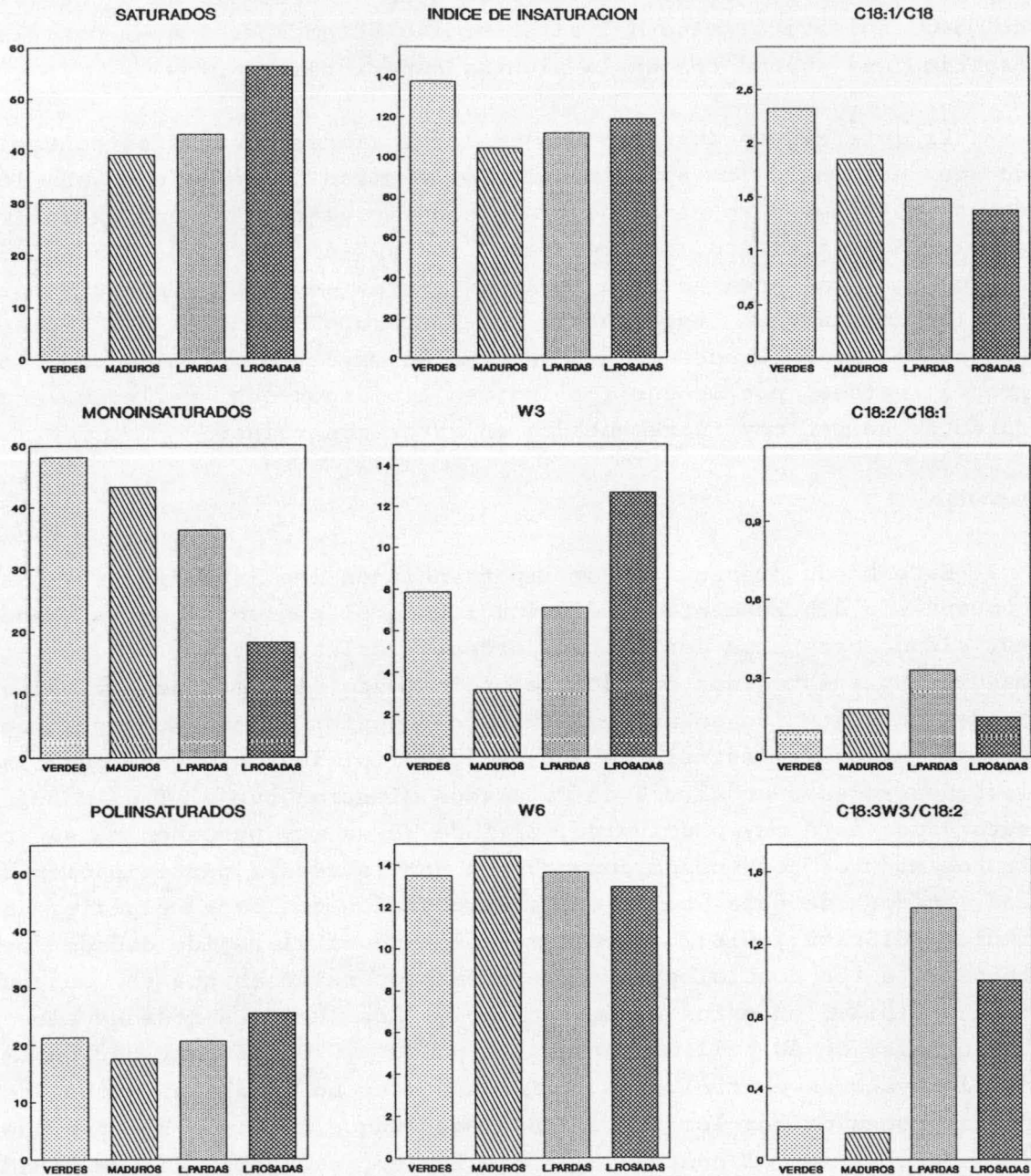


FIGURA 66.- Banda 11. Identificada como una fracción de esteroides esterificados. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series W3 y W6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 11, tras la separación en TLC -fase móvil apolar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.

puede tratarse de esteroides esterificados, por presentar la misma movilidad que el oleato de colesterol, pero no hemos identificado la especie lipídica, que en cualquier caso no se trataría de un derivado del colesterol sino del sitosterol o stigmasterol que son las especies más abundantes en la plantas superiores.

Es interesante destacar que en las lesiones rosadas el contenido de esta banda es aproximadamente la mitad del presente en los demás tejidos, pero el ácido graso constituyente casi en exclusiva es el ácido palmítico, que representa el 90% del total de los ácidos grasos que la integran. Las lesiones pardas en cambio muestran un perfil semejante al representado por los frutos maduros. Los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en mayor proporción en los frutos verdes, por lo que los índices lipídicos que reflejan este carácter se ven muy incrementados en estos controles.

BANDA 11

Esta banda presenta mayor importancia en las lesiones rosadas, compensando sobradamente la disminución en el contenido de la banda 10, siendo escasa en los frutos verdes y lesiones pardas. Los frutos maduros y los tejidos dañados, especialmente las lesiones rosadas, tienen un contenido en ácido palmítico superior al encontrado en los frutos verdes. El estudio de los índices lipídicos presenta para las lesiones rosadas un alto % de Saturados mientras que el % de Monoin-saturados está muy disminuido. El % de W3 es muy pequeño para los frutos maduros como puede comprobarse por la escasa participación de los ácidos de esta serie en la composición de esta especie. El índice $C18:3w3 / C18:2$ aparece más elevado en el tejido dañado con respecto a los controles por la escasa proporción en que se encuentra el $C18:3w3$ en estos últimos. También las lesiones rosadas elevan los niveles de AG poliinsaturados, $C18:3w6$ y $C20:5w3$ muy por encima de los valores control. Las lesiones pardas no se alejan mucho del perfil seguido por los frutos maduros, aunque también se producen incrementos en el contenido de linolénico, respecto al de ácido oléico.

El resumen de estos experimentos es difícil de hacer debido a la complejidad de los análisis numéricos necesarios para poder extraer conclusiones.

Podemos destacar que tanto en los frutos maduros como en las lesiones rosadas se observa un contenido semejante de ácidos grasos

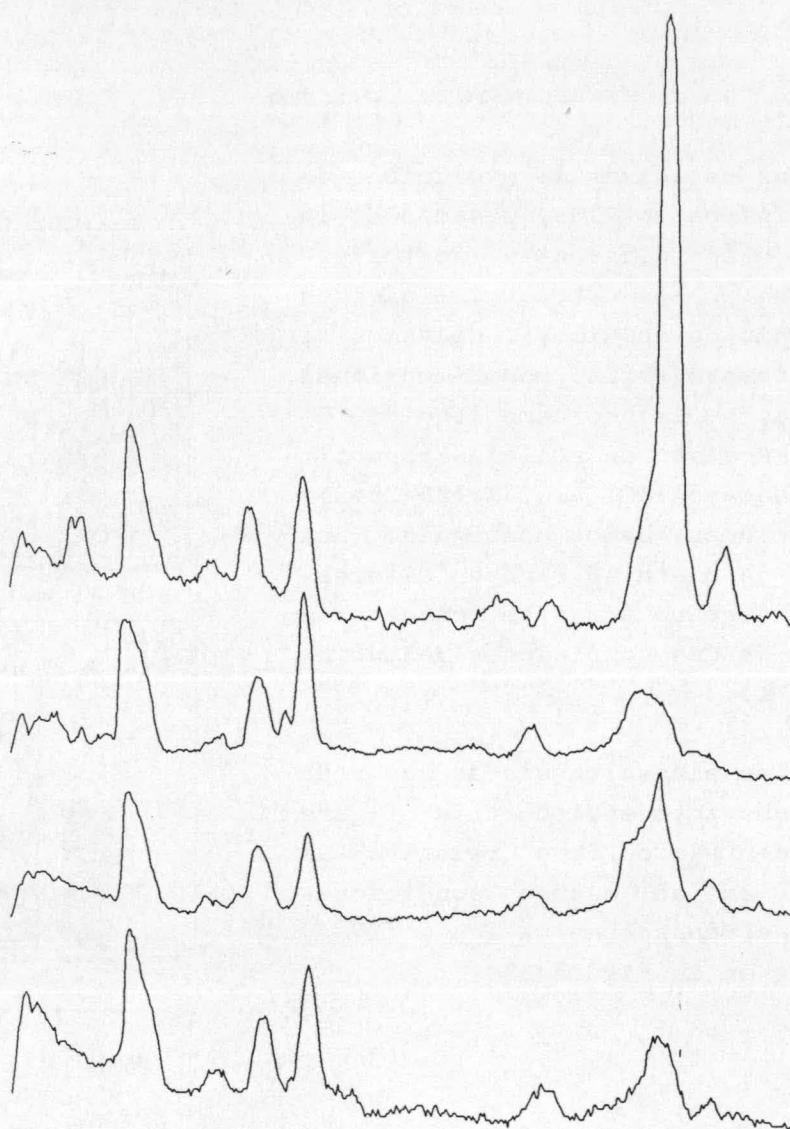


FIGURA 67.- Fotodensitogramas de las placas cromatográficas en las que se han separado por TLC (Acetato de etilo:n-propanol: cloroformo:metanol:KCl.) los lípidos extraídos de tejidos lesionados de chirimoyas o de frutos en distinto estado de maduración.

constituyentes de monoacilgliceroles y de diacilgliceroles. Sin embargo, estas similitudes se acaban al llegar a los lípidos apolares, que presentan elevadísimas cantidades de ácidos grasos saturados, especialmente palmítico, al igual que cantidades anormalmente elevadas, aunque proporcionalmente sean minoritarias, de ácidos grasos poliinsaturados.

IV.4.2.2. TLC-FASE MOVIL POLAR

Una vez estudiada la evolución de los fosfolípidos totales, pasamos a la separación de los diferentes fosfolípidos presentes en los extractos lipídicos de mesocarpio de chirimoya. Llevamos a cabo una cromatografía monodimensional en capa fina, empleando como líquido de desarrollo Acetato de etilo:n-Propanol:Cloroformo:Metanol:KCl al 15% (25:25:25:10:9) en volumen. Hemos conseguido una separación de hasta 16 bandas diferentes, sin embargo no todas se encuentran en cada una de las condiciones estudiadas (Lámina I).

Sobre las placas reveladas con yodo realizamos una fotodensitometría Figura 67. El porcentaje de área relativa de cada banda en las cuatro condiciones estudiadas se muestra en la Tabla XXV y gráficamente en la Figura 68.

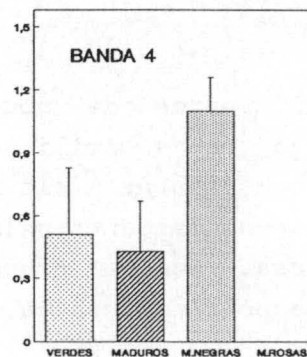
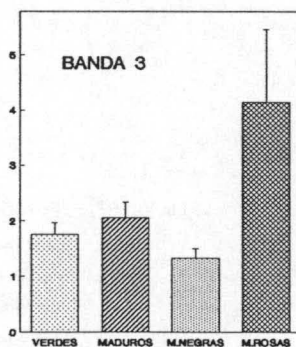
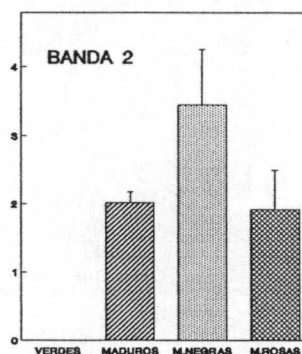
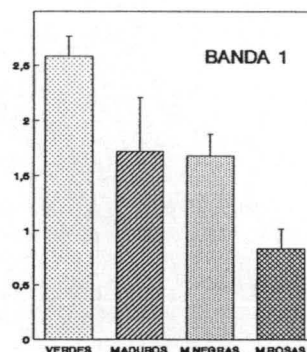


FIGURA 68.- Contenido porcentual de las especies lipídicas obtenidas por TLC con fase móvil polar, en tejidos controles y lesionados de mesocarpio de frutos de chirimoyo.

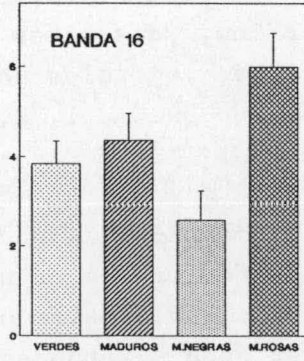
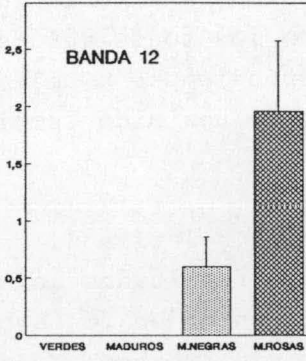
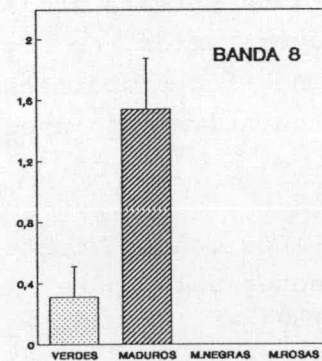
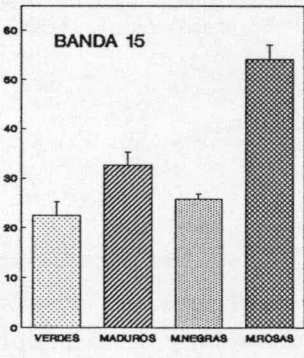
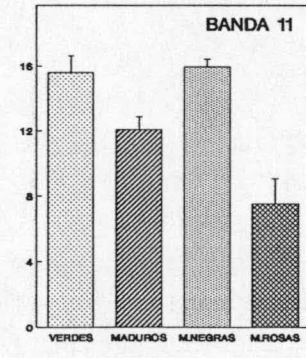
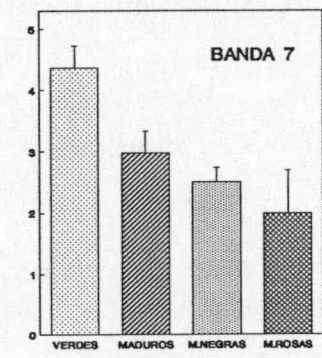
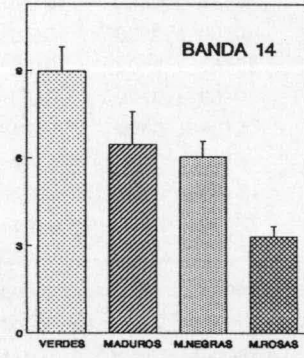
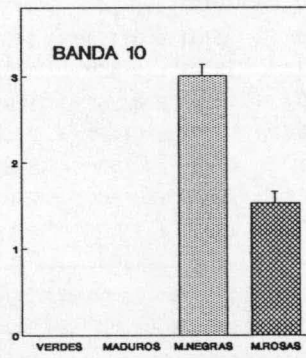
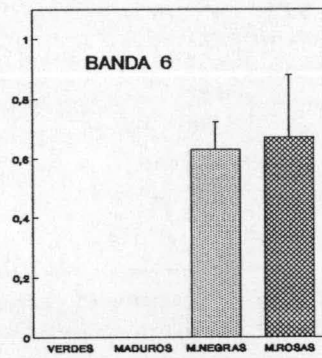
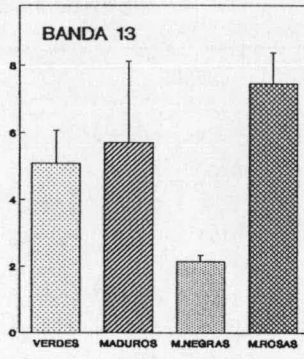
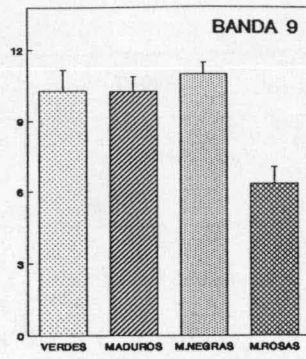
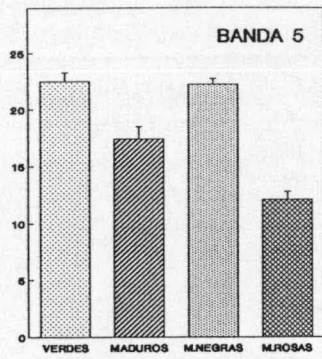


TABLA XXV.- % en peso de las diferentes bandas obtenidas en la cromatografía en capa fina, empleando como líquido de desarrollo "Acetato de etilo:n-propanol:cloroformo:metanol:KCl."

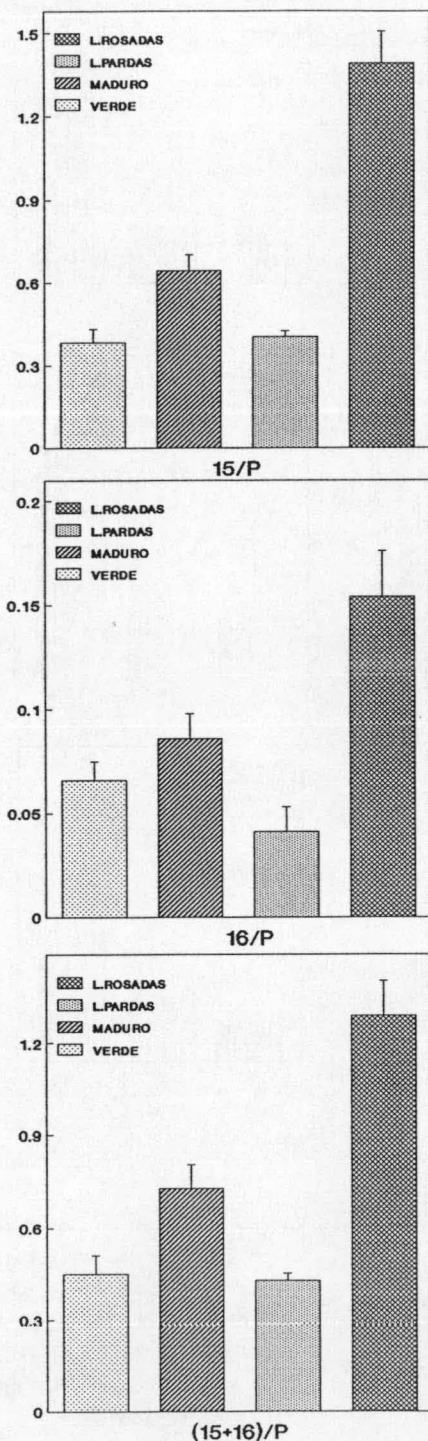
BANDA	VERDE	MADURO	L.PARDAS	L.ROSADAS	IDENTIFICACION
1	2'58 ± 0'18	1'72 ± 0'49	1'68 ± 0'20 ^a	0'84 ± 0'18 ^a	SM
2	0'00 ± 0'00	2'02 ± 0'16 ^a	3'44 ± 0'82 ^a	1'91 ± 0'58 ^a	SM
3	1'76 ± 0'20	2'06 ± 0'28	1'32 ± 0'18 ^b	4'15 ± 1'32	LPC
4	0'51 ± 0'32	0'43 ± 0'24	1'10 ± 0'16 ^b	0'00 ± 0'00	
5	22'49 ± 0'78	17'44 ± 1'07 ^a	22'20 ± 0'55 ^b	12'07 ± 0'66 ^{ab}	PC
6	0'00 ± 0'00	0'00 ± 0'00	0'63 ± 0'09 ^{ab}	0'67 ± 0'21 ^{ab}	
7	4'36 ± 0'36	2'98 ± 0'35 ^a	2'51 ± 0'23 ^a	2'00 ± 0'70 ^a	
8	0'31 ± 0'20	1'54 ± 0'34 ^a	0'00 ± 0'00	0'00 ± 0'00	
9	10'28 ± 0'88	10'26 ± 0'60	10'97 ± 0'49	6'37 ± 0'68 ^{ab}	PE
10	0'00 ± 0'00	0'00 ± 0'00	3'01 ± 0'13 ^{ab}	1'53 ± 0'13 ^{ab}	
11	15'63 ± 1'02	12'08 ± 0'82 ^a	15'99 ± 0'47 ^b	7'52 ± 1'58 ^{ab}	
12	0'00 ± 0'00	0'00 ± 0'00	0'60 ± 0'26 ^{ab}	1'96 ± 0'61 ^{ab}	
13	5'09 ± 0'99	5'71 ± 2'40	2'16 ± 0'19 ^a	7'48 ± 0'90	
14	8'99 ± 0'84	6'47 ± 1'11	6'05 ± 0'52 ^a	3'29 ± 0'36 ^{ab}	
15	3'70 ± 0'71	4'02 ± 0'87 ^a	3'15 ± 0'60	7'03 ± 1'17 ^a	EE
16	22'50 ± 2'30	32'64 ± 2'70	25'75 ± 1'09 ^b	54'19 ± 2'82 ^{ab}	

Los resultados están expresados como la media de los porcentajes ± S.E.M. El tratamiento estadístico se ha realizado de acuerdo con el test de la "t" de Student. ^a y ^b = P < 0'05 cuando se comparan respectivamente el tejido verde con los demás o el tejido maduro con los lesionados. SM = Esfingomielinas. LPC = Lisofosfatidilcolina. PC = Fosfatidilcolina. PE = Fosfatidiletanolamina. EE = Esteroles esterificados.

IV.4.2.2.1. ESTUDIO DE LAS BANDAS CROMATOGRAFICAS

Las diferentes bandas se han tratado de identificar por comparación de los Rf de nuestras muestras y de los patrones disponibles, obteniéndose únicamente una identificación inequívoca en el caso de las bandas 5 y 9, correspondientes a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, descritos como los fosfolípidos mayoritarios en las membranas vegetales correspondientes a tejidos no fotosintéticos, aunque las bandas 1, 2, 3 y 15 han sido también tentativamente identificadas.

Al comparar la abundancia relativa de cada banda con el contenido en fósforo se encuentran resultados coincidentes salvo para la banda 11, que muestra un contenido en fósforo inferior al que cabría esperar dada su abundancia, sin embargo su coloración de un amarillo más intenso que el resto de las bandas, unido al hecho de que en



ocasiones, pese a esa coloración intensa, su contenido en fósforo estaba en el límite de la detección, nos induce a pensar que podría tratarse de un fosfolípido contaminado con otros componentes lípidicos, tal vez glucolípidos.

Las bandas 15 y 16 aparecen como las más apolares. Por su Rf podría tratarse de esteroides esterificados correspondiendo a especies moleculares diferentes. La banda 15 presentó el mismo Rf que el oleato de colesterol usado como patrón de identificación. La posibilidad de que la banda 16 estuviese formada por una mezcla de hidrocarburos, fue descartada al estudiar la composición de los ésteres metílicos correspondientes. Hemos estudiado la relación de cada una de ellas por separado y de la suma de ambas frente al total de fosfolípidos. La relación 15/P no muestra variaciones significativas entre las lesiones pardas y los controles verdes, aunque sí es significativamente

FIGURA 69.- Relaciones entre el contenido porcentual de lípidos neutros frente al contenido total de fosfolípidos.

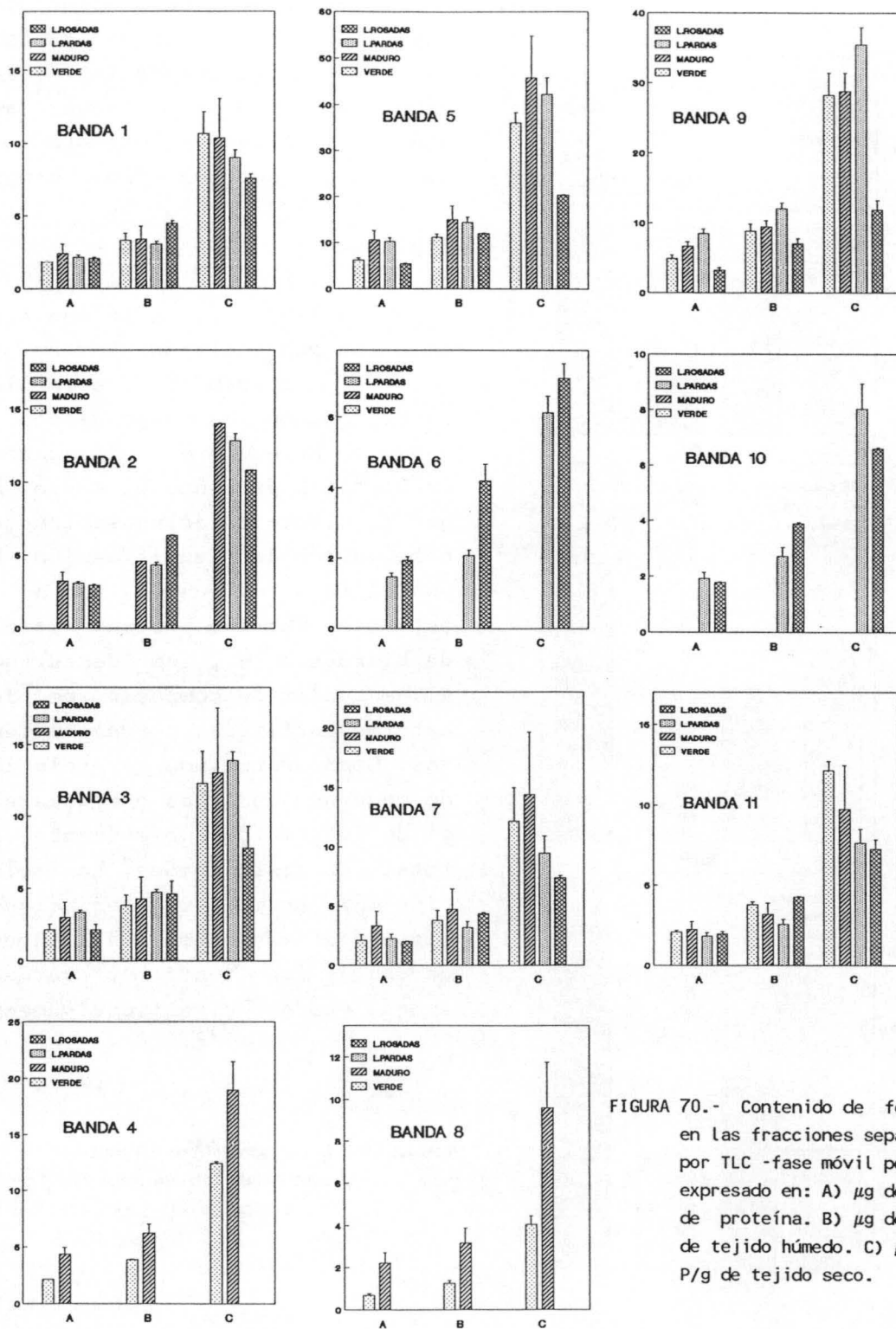


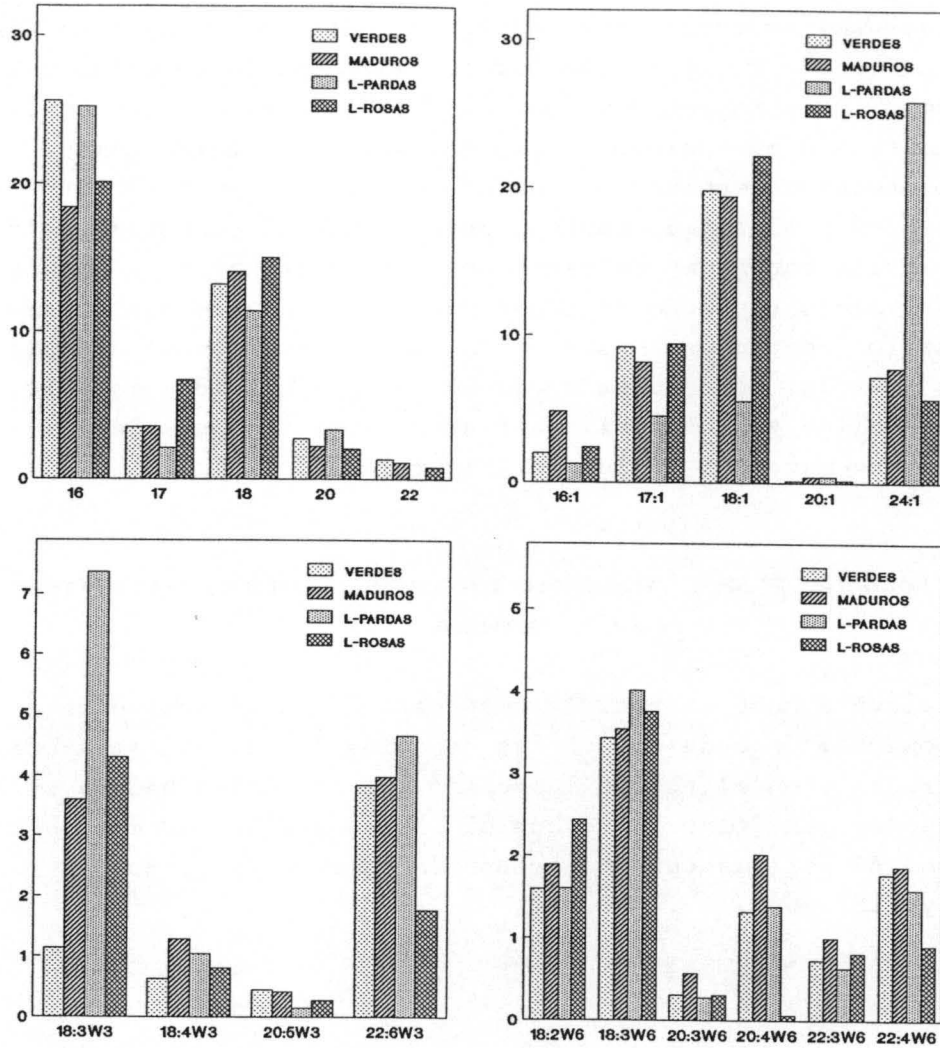
FIGURA 70.- Contenido de fósforo en las fracciones separadas por TLC -fase móvil polar-, expresado en: A) μg de P/mg de proteína. B) μg de P/g de tejido húmedo. C) μg de P/g de tejido seco.

menor que en los frutos maduros. En las lesiones rosadas el incremento con respecto a los controles verdes supera el 400%. Resultados similares se observan en las otras relaciones (Figura 69).

Determinamos el contenido en fósforo de las 16 especies lipídicas separadas, encontrándose resultado positivo en las once primeras. El contenido en μg de fósforo en cada especie se refirió a g de tejido seco, g de tejido húmedo y finalmente a mg de proteína. Cuando el contenido en fósforo se expresa por g de tejido húmedo o por mg de proteína no encontramos diferencias muy significativas entre los controles y el tejido dañado, pero cuando el contenido en fósforo se expresa por gramo de peso seco las diferencias se acentúan y en general ambos tipos de lesiones muestran menor contenido en fósforo que los controles, disminución que es mayor en el caso de las lesiones rosadas, como puede verse en los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, mientras que las lesiones pardas apenas muestran variación (Figura 68).

IV.4.2.2.2 ACIDOS GRASOS CONSTITUYENTES DE CADA BANDA.

Se llevó a cabo un estudio comparativo de la evolución de los AG componentes de cada una de las especies lipídicas separadas en los controles y en el tejido lesionado. En todas las bandas analizadas, el ácido palmítico junto con el oléico son los AG más abundantes. Los AG poliinsaturados presentes en mayor proporción son el C18:3w3 y C18:3w6.



Banda 1

Presenta una movilidad semejante a la de las esfingomielinas empleadas como patrón de identificación. Sin embargo esta banda, a veces, aparecía resuelta como una estrecha franja muy nítida mientras que en otras ocasiones resultaba mucho más difusa. Se encuentra presente en todas las condiciones pero es más abundante en los frutos verdes. Del análisis de los índices lipídicos sólo encontramos diferencias importantes en el % de la serie W3 que se encuentra muy elevado en las lesiones pardas.

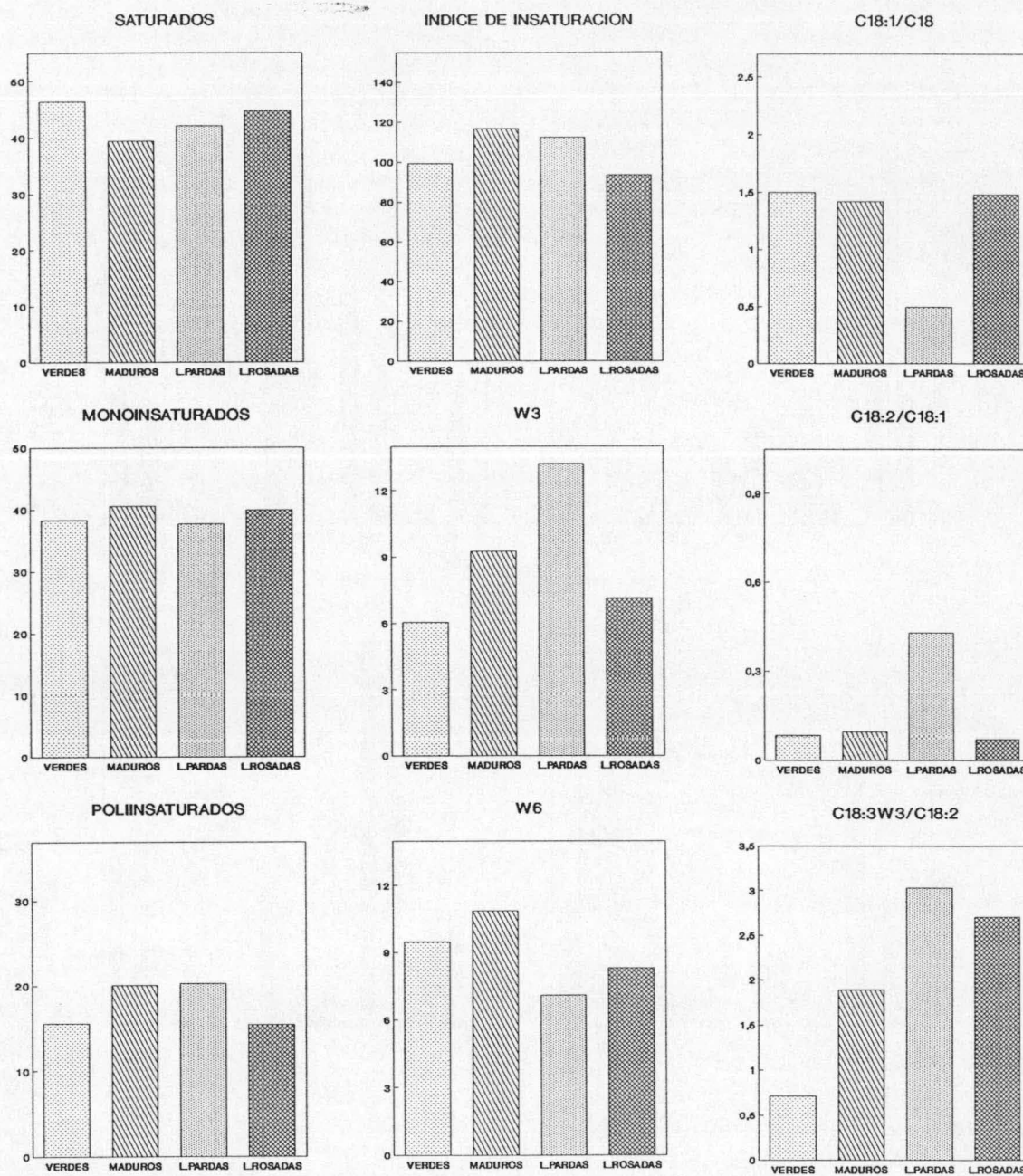
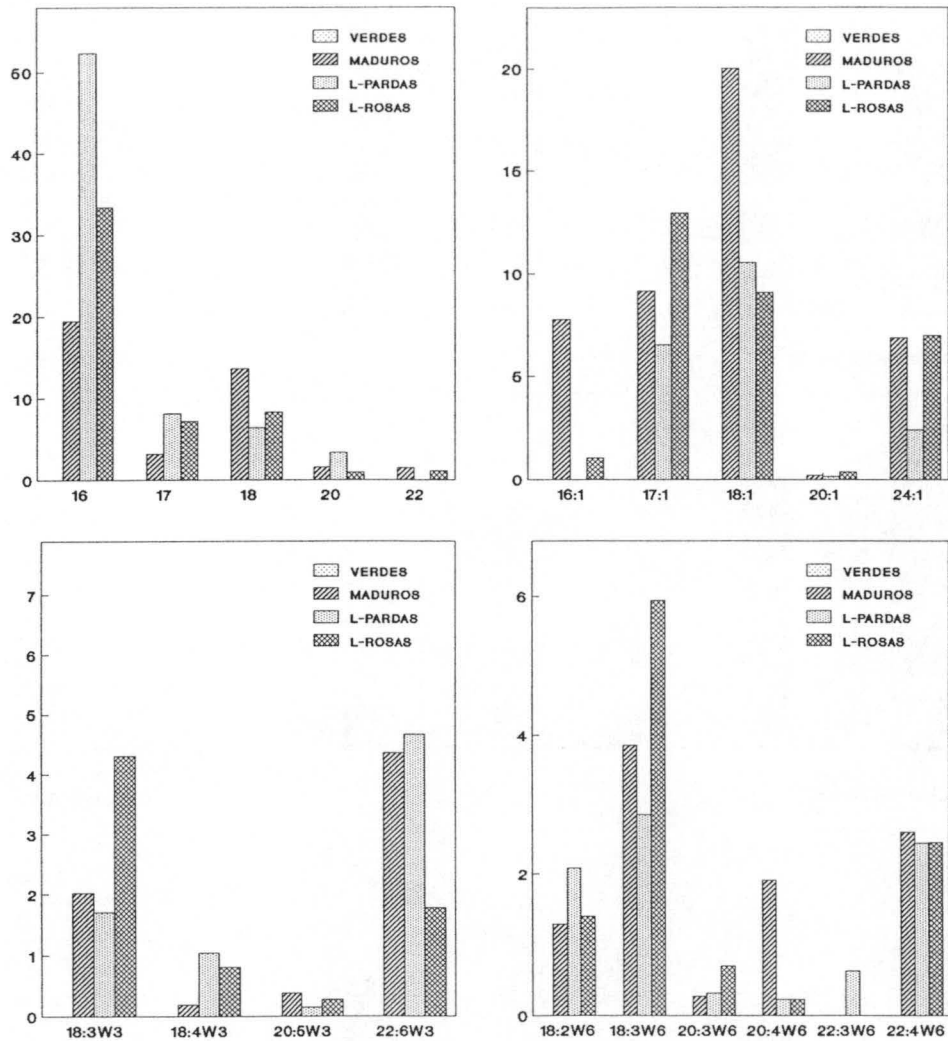


FIGURA 71.- Banda 1. Identificada como una fracción de esfingomielinas. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica n° 1, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



BANDA 2

Esta banda, ausente en los frutos verdes, presenta una abundancia ligeramente superior en las lesiones pardas, que muestra una disminución en el contenido de AG monoinsaturados y en cambio elevan su contenido en palmítico y C18:3w3. Las lesiones rosadas también disminuyen su contenido en AG monoinsaturados frente al encontrado en los frutos maduros.

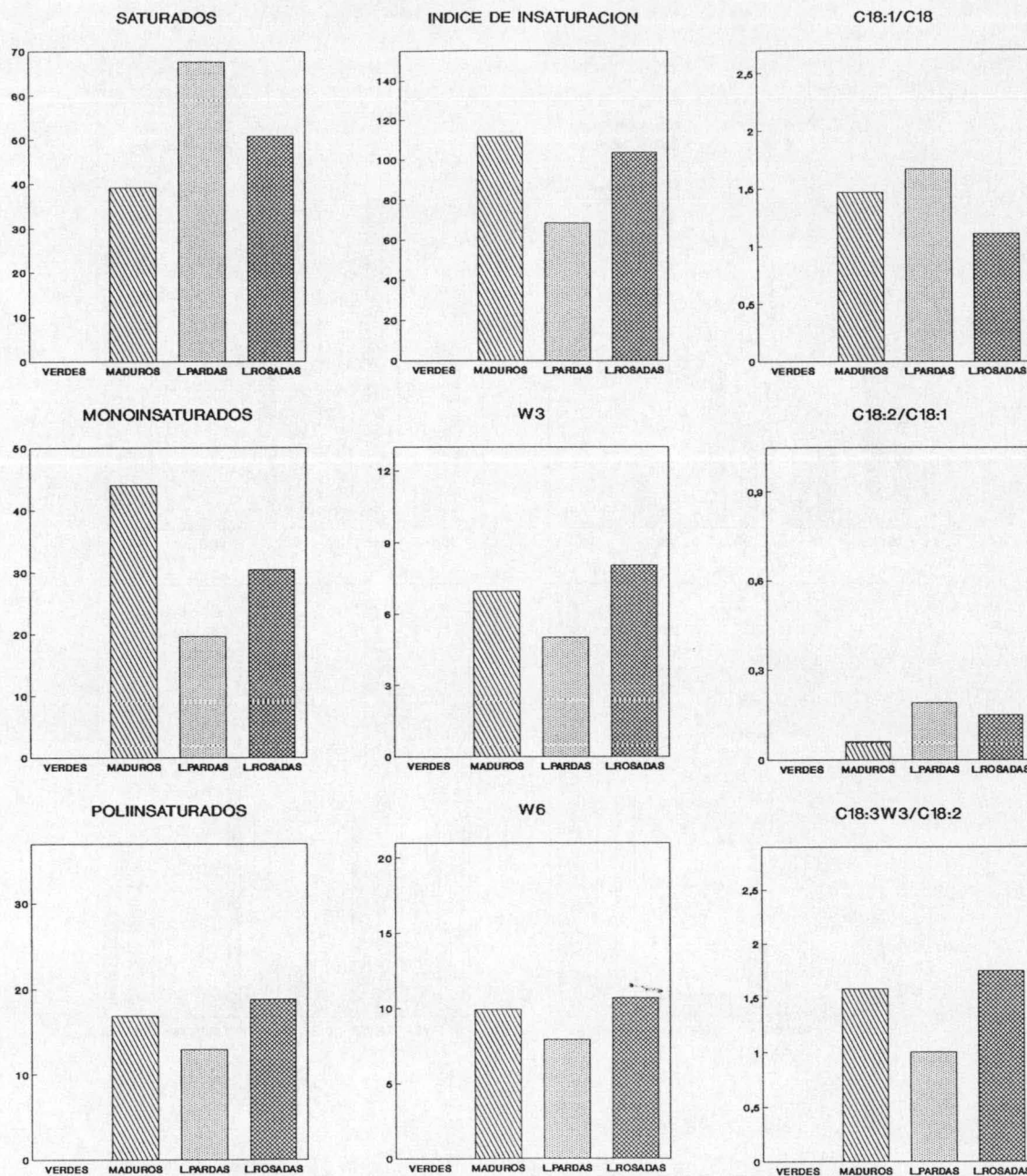
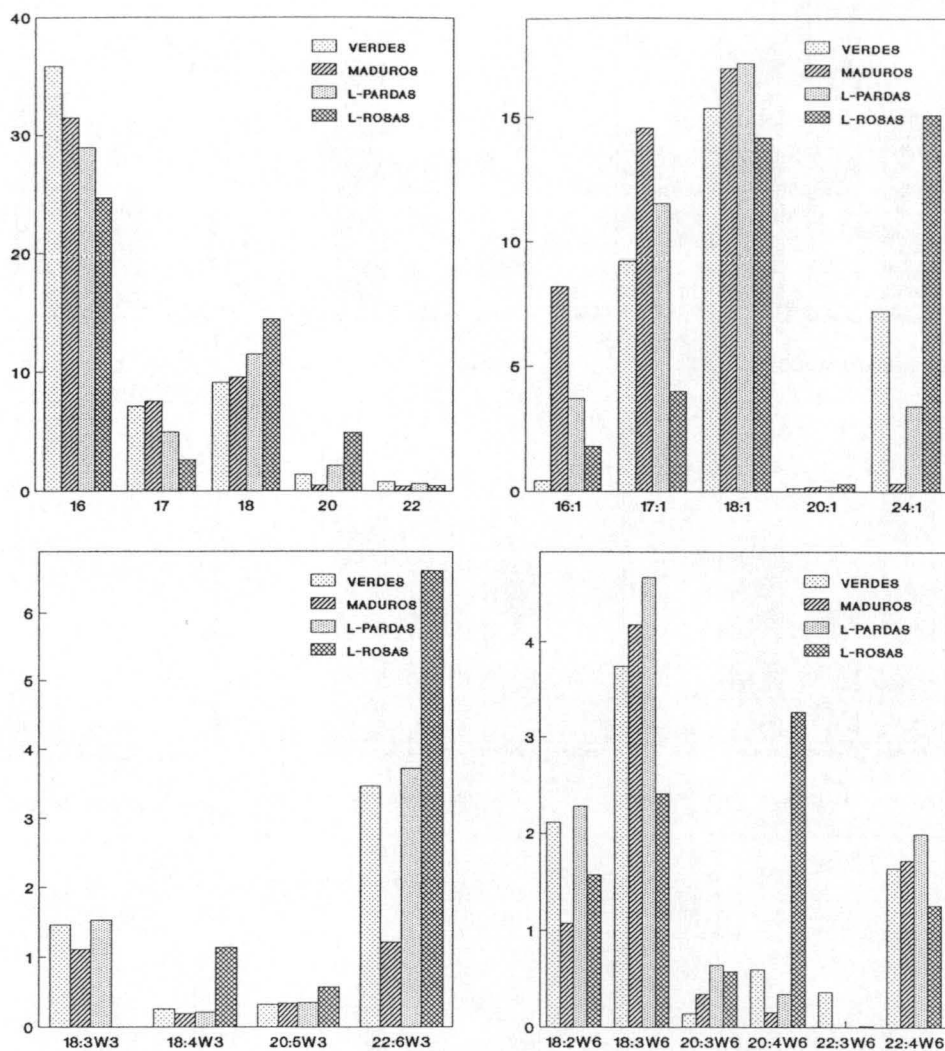


FIGURA 72.- Banda 2. Identificada como una fracción de esfingomielinas. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 2, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



BANDA 3

Esta banda presenta la misma movilidad cromatográfica que la lisofosfatidilcolina, empleada como patrón de identificación. Su importancia es mayor en las lesiones rosadas. No se aprecia una diferencia muy acusada en la composición de esta banda en las diferentes condiciones. El alto porcentaje del C24:1 y C22:6w3 marca la diferencia entre las lesiones rosadas y los frutos control.

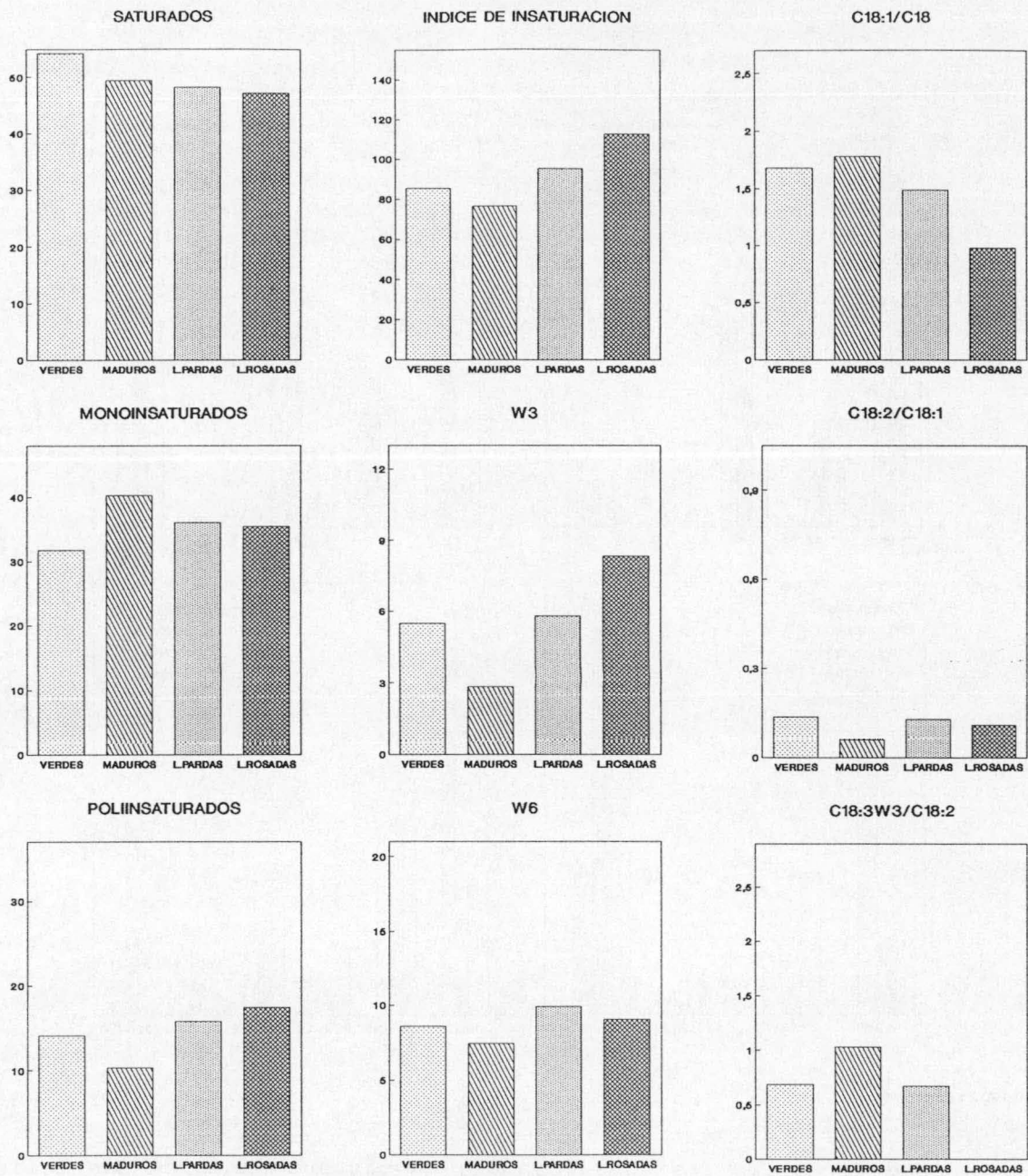
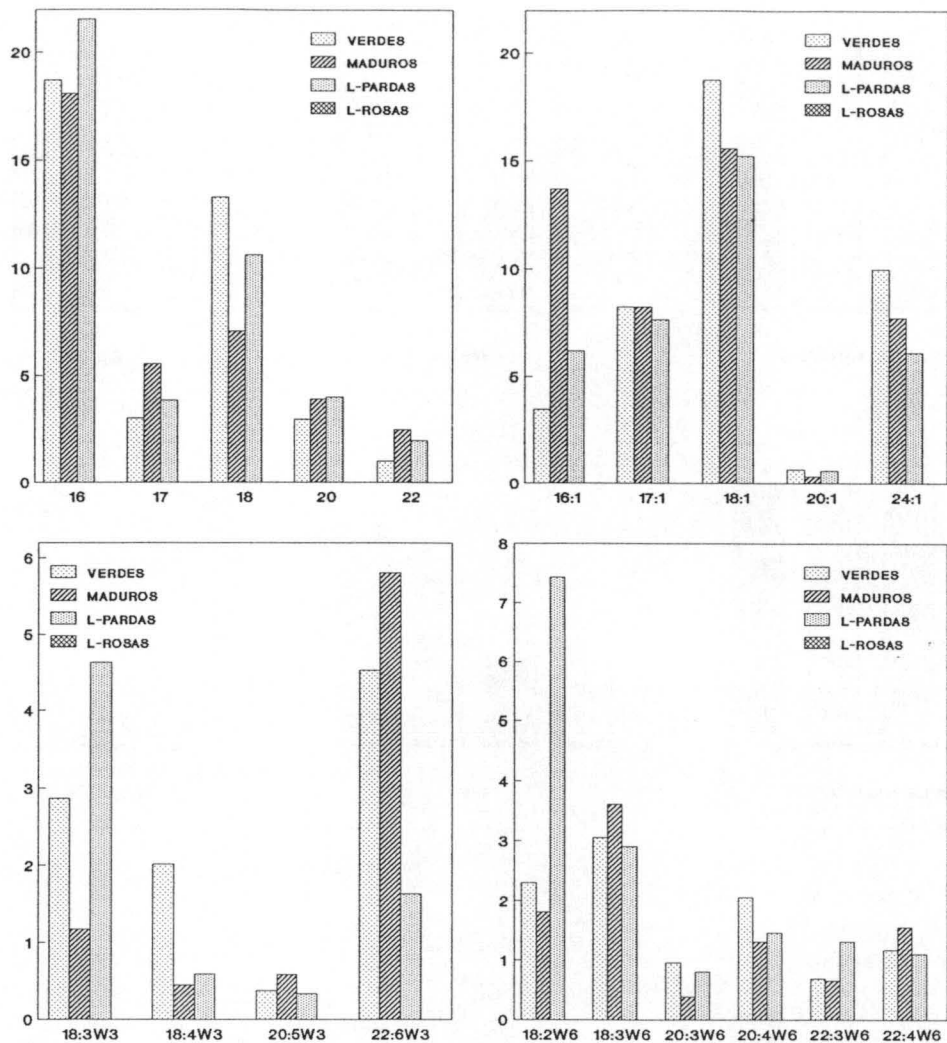


FIGURA 73.- Banda 3. Identificada como una fracción de lisofosfatidil-colina. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 3, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Banda 4

Ausente en las lesiones rosadas, es más abundante en las lesiones pardas que en los frutos verdes y maduros donde se mantiene al mismo nivel de importancia. Los índices lipídicos marcan una diferencia en el % de W3, disminuido en las lesiones pardas, que a pesar del alto contenido en C18:3w3 el resto de los componentes de la serie se encuentran disminuidos frente a los controles. Sin embargo el nivel alcanzado por el C18:2w6 en este tejido, frente a los frutos control, hace que tanto el % de W6, como el índice C18:2/C18:1 aparezcan notablemente elevados.

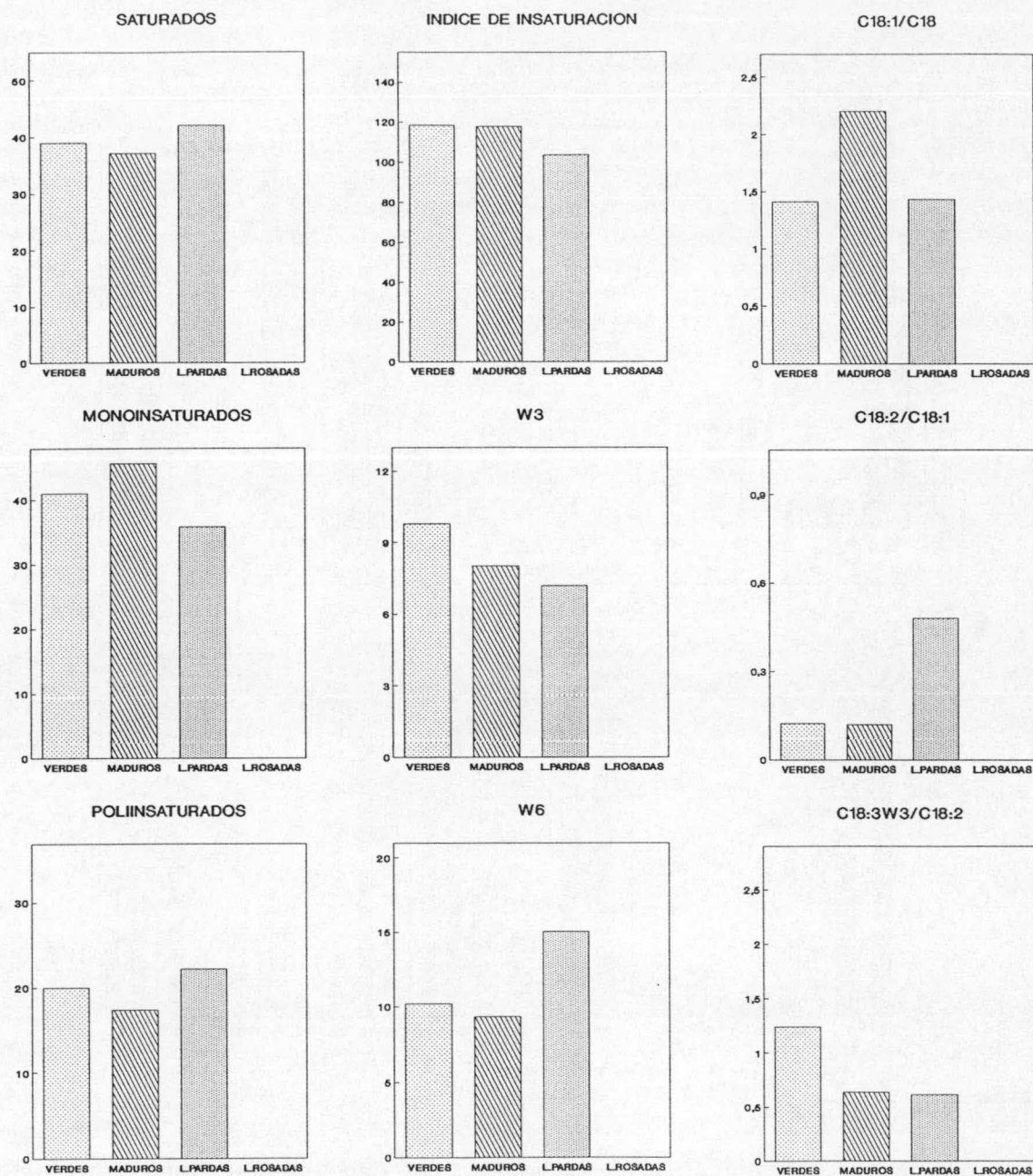
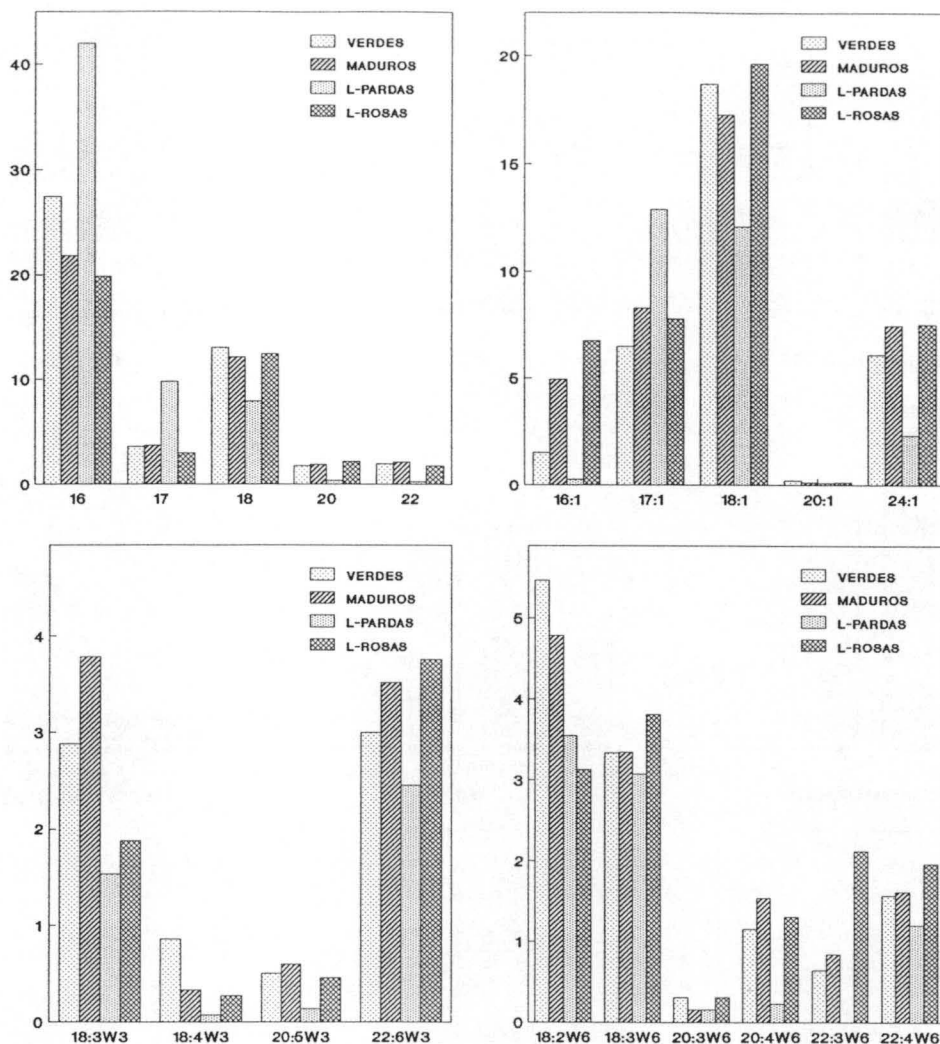


FIGURA 74.- Banda 4. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 4, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Banda 5

Dado que presenta la misma movilidad que los patrones empleados y como además está descrito que es el fosfolípido mayoritario componente de las membranas en las células vegetales y también en nuestras muestras resulta ser el componente mayoritario de la fracción de fosfolípidos, se ha identificado como fosfatidilcolina (PC). Presenta una abundancia semejante en los frutos verdes y en las lesiones pardas, mientras que en los frutos maduros y en las lesiones rosadas es algo menor. El estudio de los índices lipídicos, muestra una elevación en el % de AG Saturados en las lesiones pardas

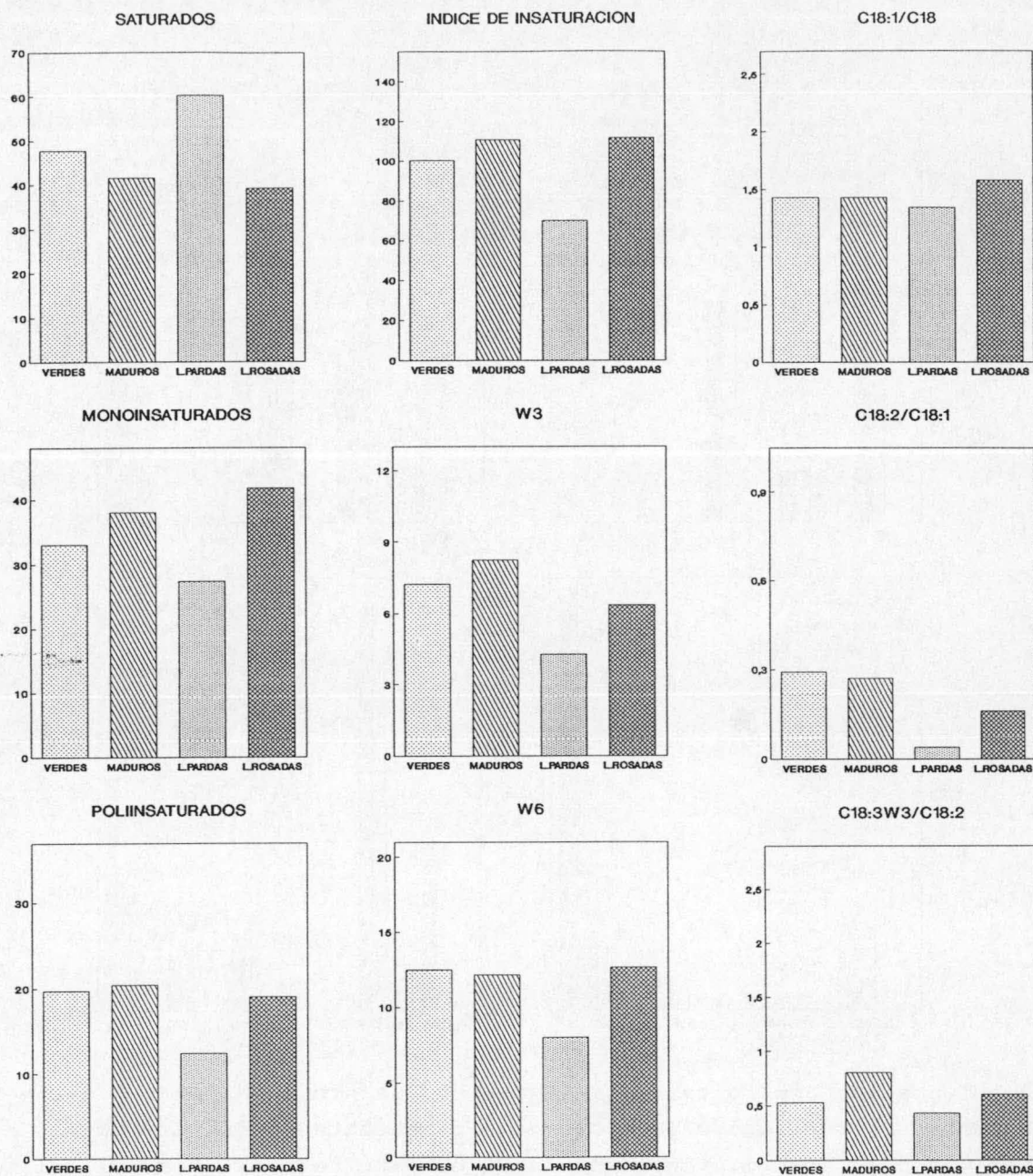
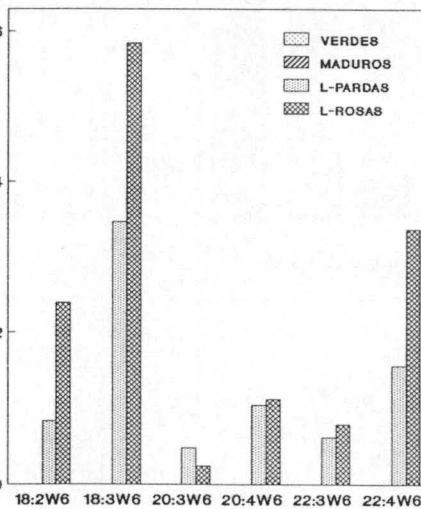
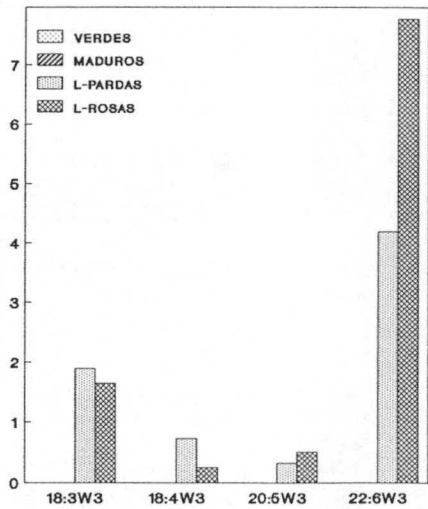
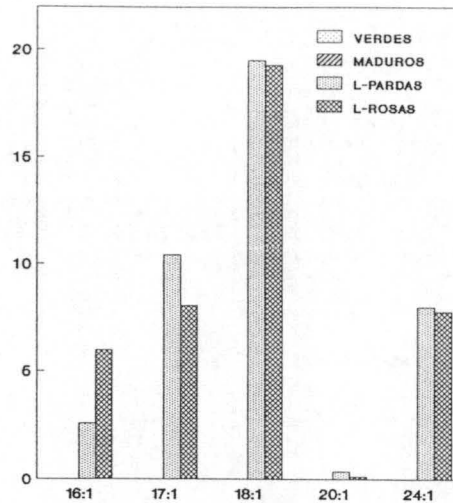
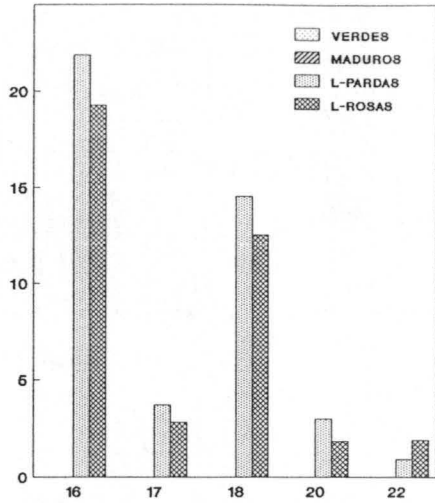


FIGURA 75.- Banda 5. Identificada como la fracción de fosfatidil-colina. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica n° 1, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



frente a los controles. Este incremento es producido por el nivel alcanzado por el ácido palmítico que representa el 42% del total de los ácidos constituyentes de la PC en este tejido. Por el mismo motivo los otros índices aparecen disminuidos.

Banda 6

Esta banda sólo se encuentra en el tejido dañado con la misma abundancia relativa. No hay grandes diferencias en la composición de AG saturados y monoinsaturados, siendo el ácido palmítico y el oléico los dos más abundantes. Al analizar los índices lipídicos

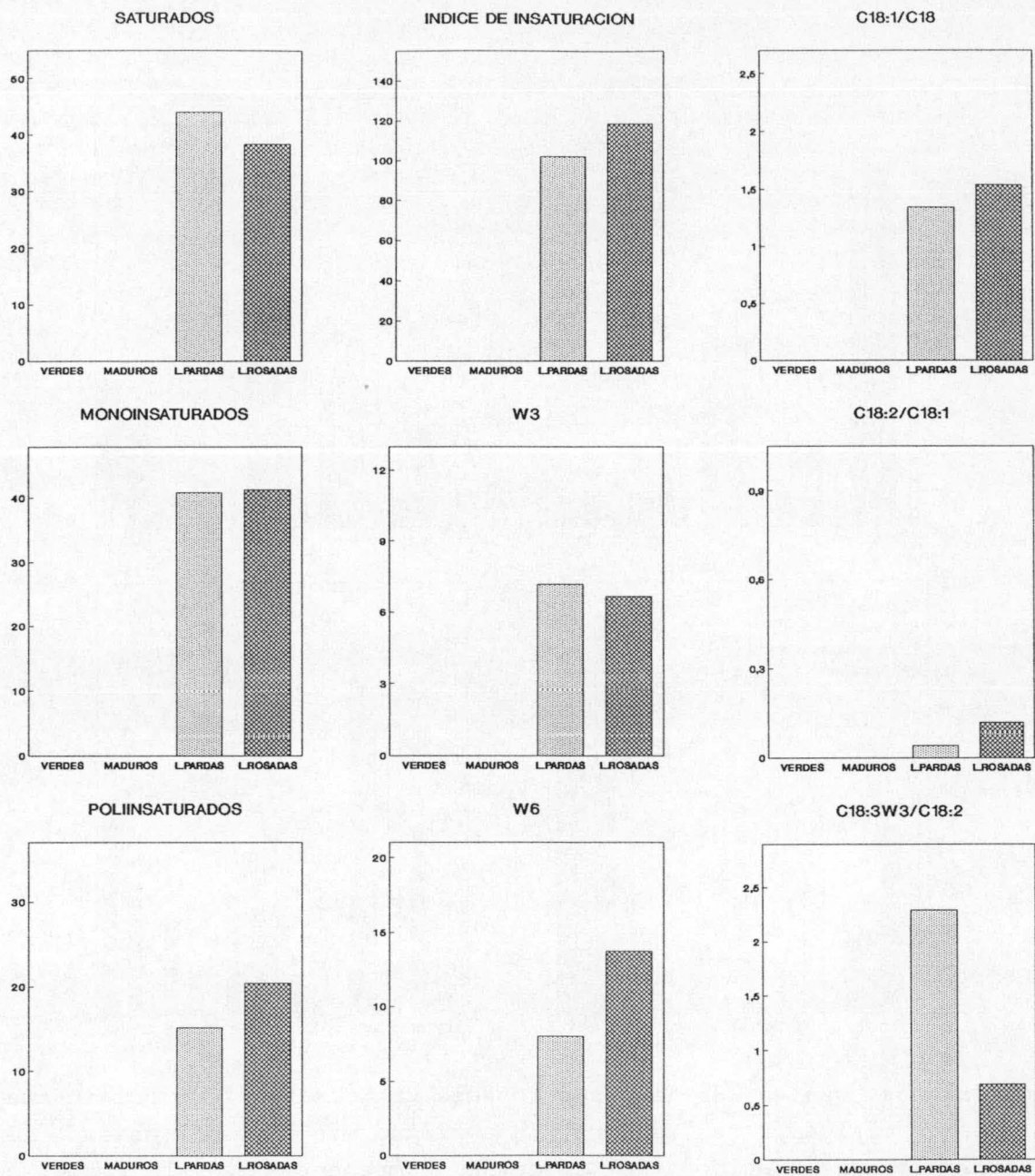
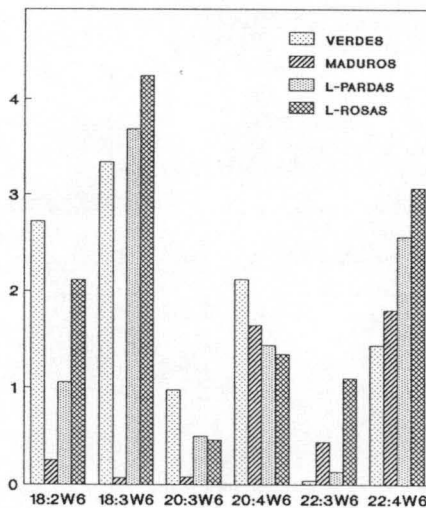
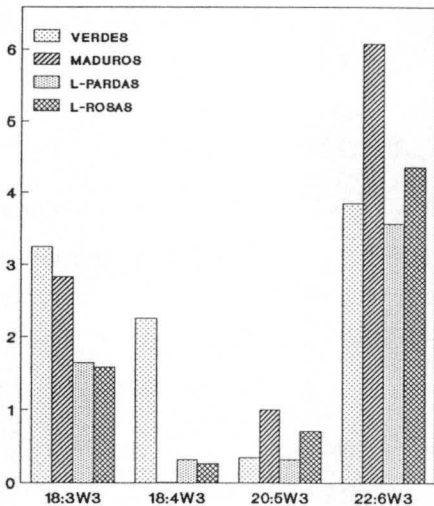
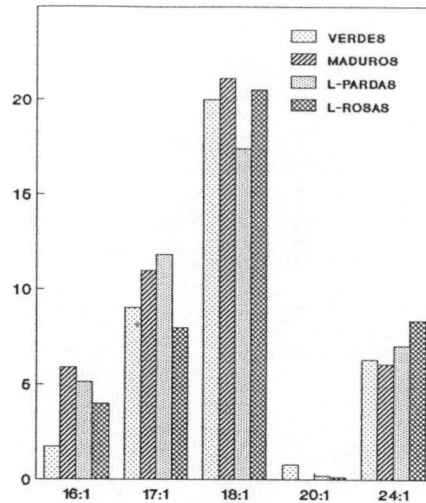
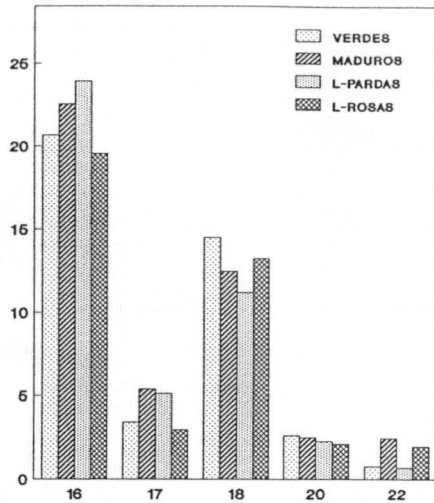


FIGURA 76.- Banda 6. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica n° 6, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



observamos, que en las lesiones rosadas EL % de W6, % de Poliinsaturados y el Índice de Insaturación aparecen más elevados en las lesiones rosadas, debido a que todos los componentes de esta serie se encuentran en mayor proporción en este tejido que en las lesiones pardas. El índice C18:3/C18:2 mucho más elevado en las lesiones pardas se debe al bajo porcentaje del C18:2w6, mientras que el alto contenido en C18:1 hace que el C18:2/C18:1 resulte muy pequeño.

Banda 7

Por su movilidad podría tratarse del ácido fosfatídico. Se

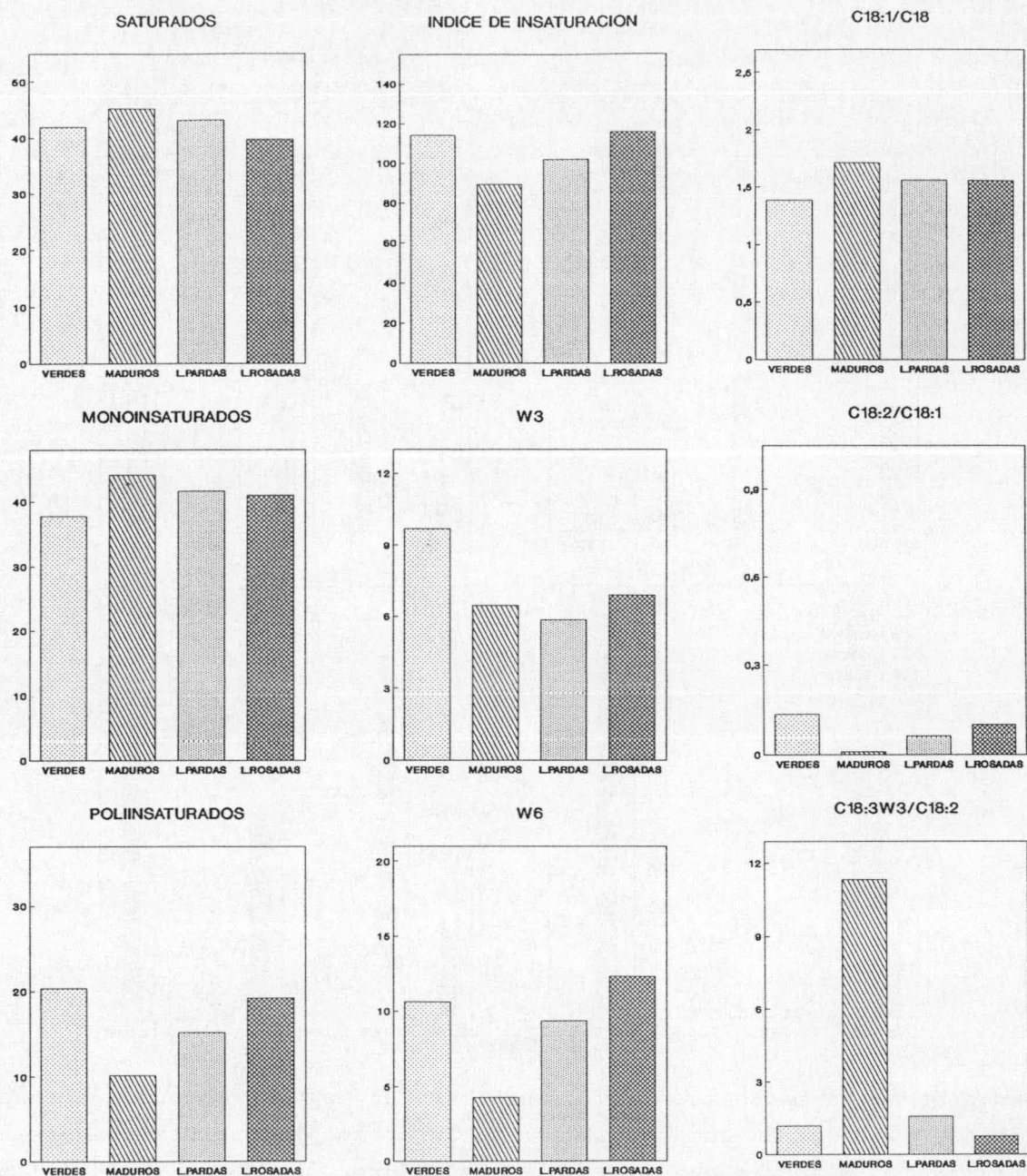
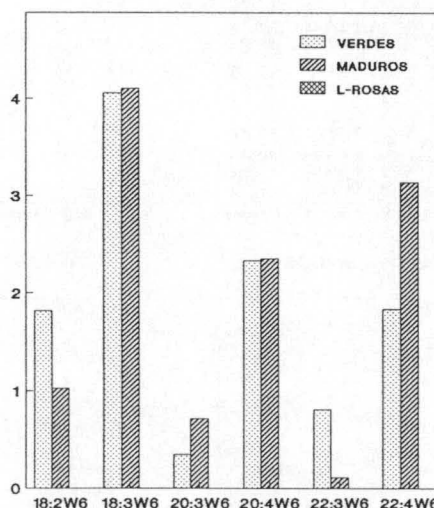
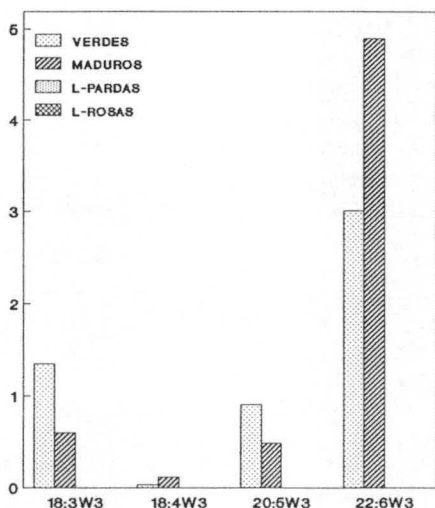
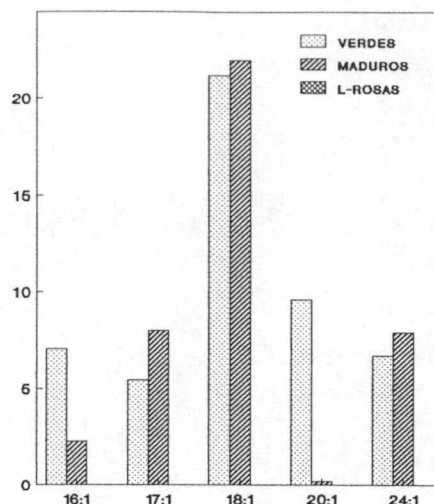
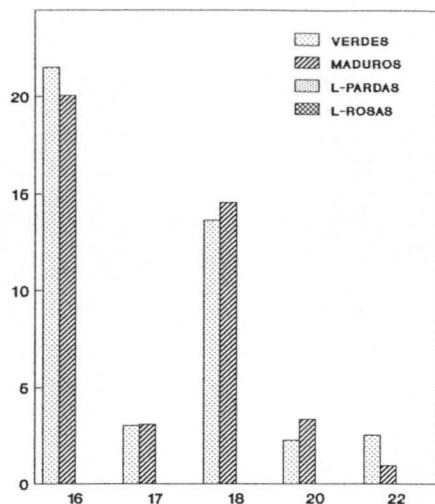


FIGURA 77.- Banda 7. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 7, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



encuentra en todas las condiciones pero en mayor proporción en los frutos verdes. Su composición en AG saturados y monoinsaturados es semejante. Mientras que en los frutos maduros los AG de la serie w6 tienen muy poca representación, en el tejido dañado son muy abundantes, esto queda reflejado al estudiar los índices % de W6 y % de Poliinsaturados. EL alto contenido que muestra esta especie en C18:1 y la escasa presencia del C18:2 son responsables de que la relación C18:2/C18:1 sea extraordinariamente pequeña mientras que la C18:3/-C18:2 se encuentre muy por encima de las otras condiciones.

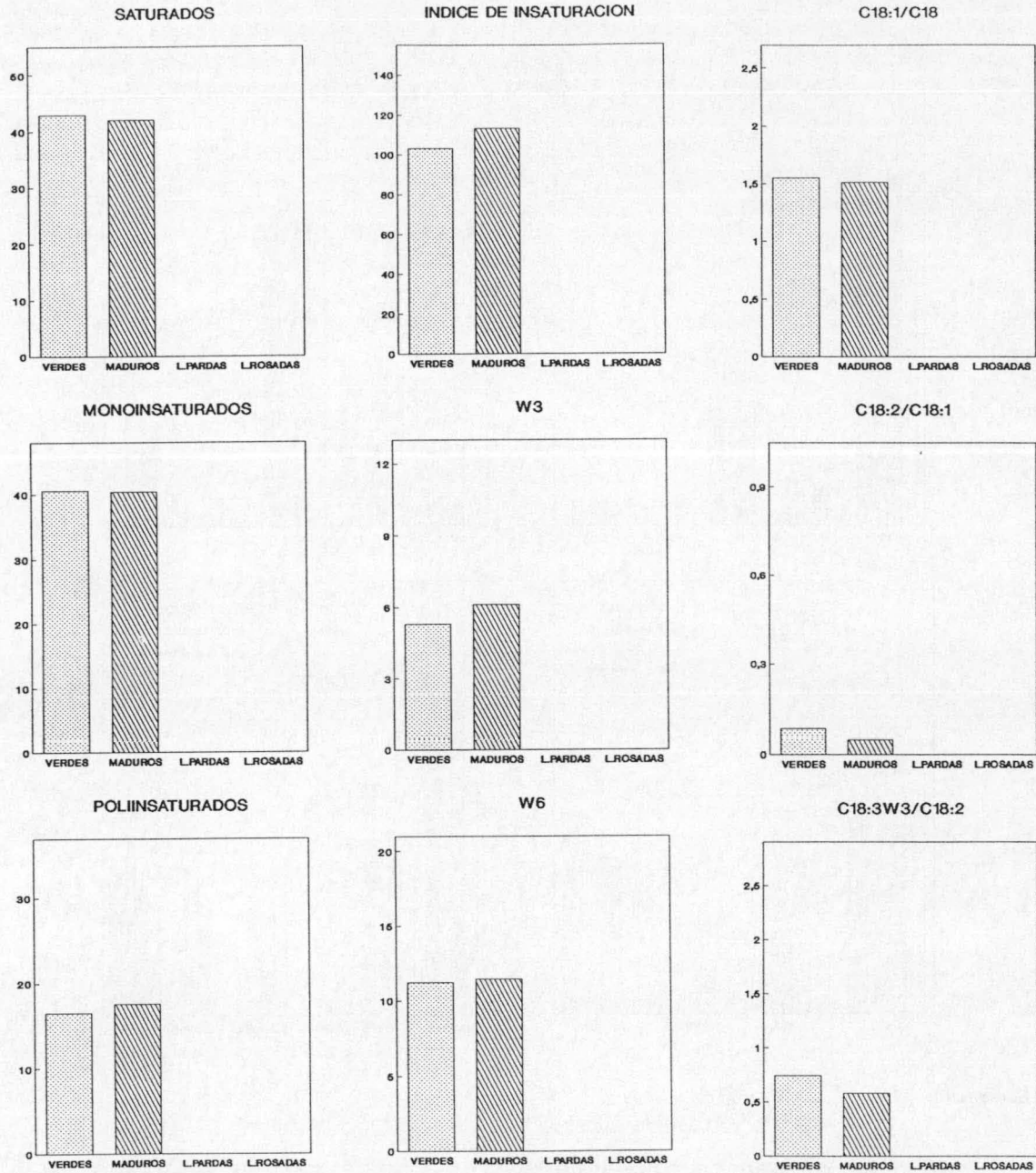
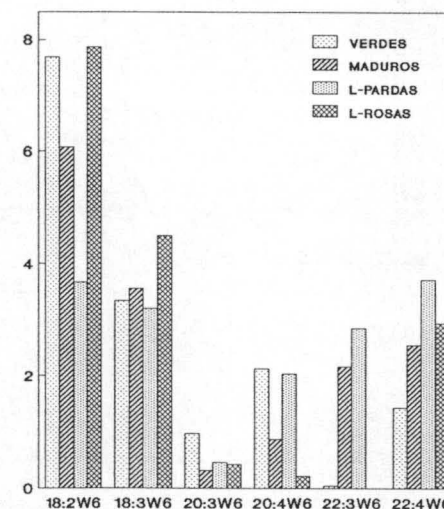
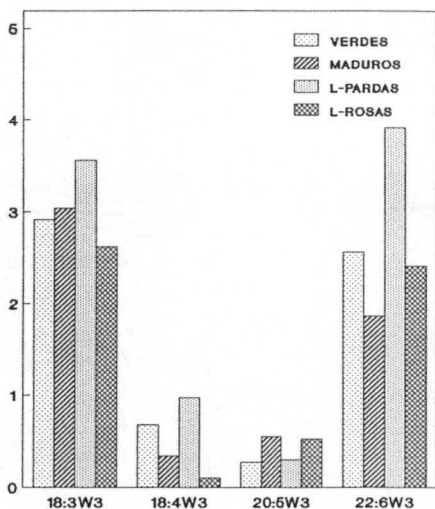
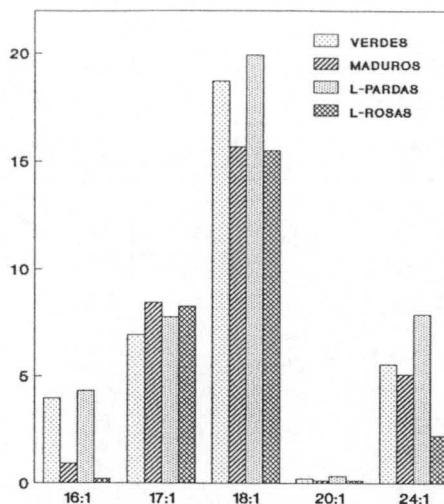
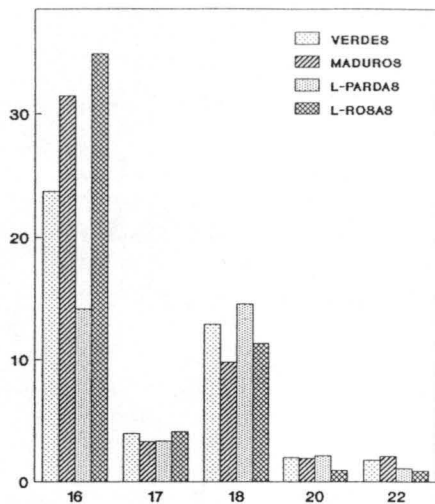


FIGURA 78.- Banda 8. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 8, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Banda 8

Sólo se encuentra presente en los frutos verdes y en los maduros. En ambas condiciones presenta un perfil en la composición de AG muy semejante.

Banda 9

Es el segundo fosfolípido en importancia. Se ha identificado como Fosfatidiletanolamina (PE), por el valor de su Rf y por ser junto con la fosfatidilcolina uno de los componentes mayoritarios en

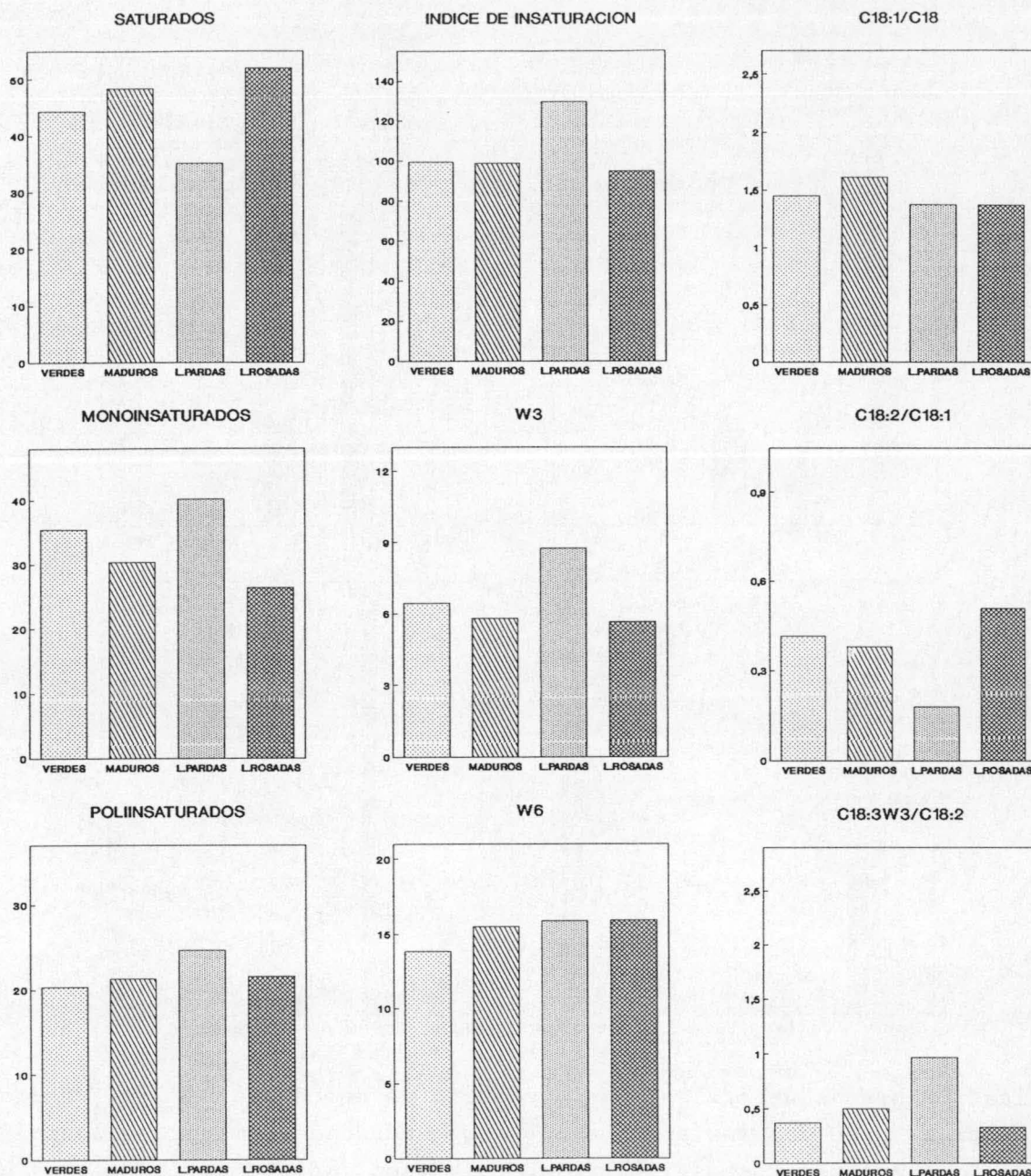
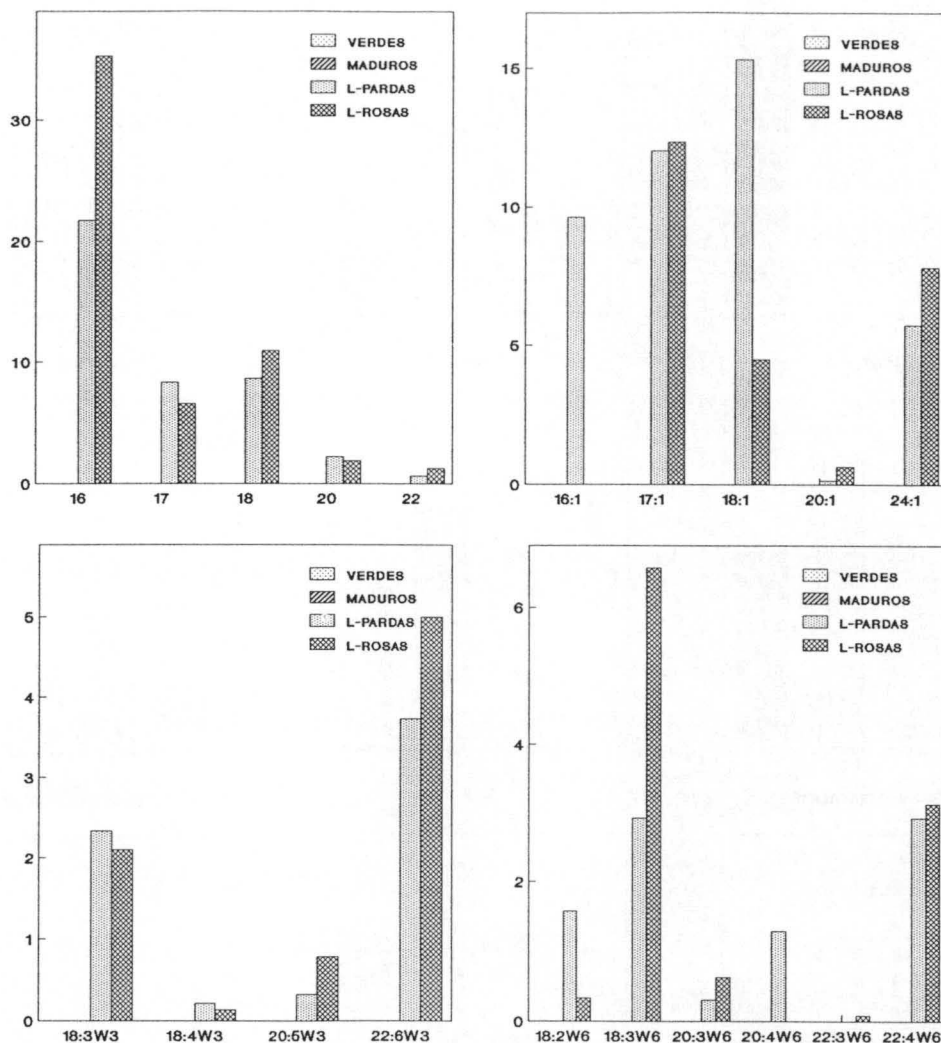


FIGURA 79.- Banda 9. Identificada como la fracción de fosfatidil-etanolamina. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 9, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



las membranas vegetales. Su abundancia es semejante en los frutos control y en las lesiones pardas encontrándose en menor proporción en las lesiones rosadas. El ácido palmítico sólo contribuye con un 14% en la composición de la PE, en las lesiones pardas, esto hace que el índice de saturados aparezca disminuido en este tejido frente a los controles, mientras que en las lesiones rosadas resulta ligeramente superior. El ácido oléico se encuentra en un porcentaje similar en todas las condiciones, mientras que el C18:2w6 aparece disminuido en las lesiones pardas lo que hace que el índice C18:2/-C18:1 resulte más bajo para este tejido, mientras que el C18:3w3/-C18:2w6 aparezca más elevado. Aunque las diferencias en los porcen-

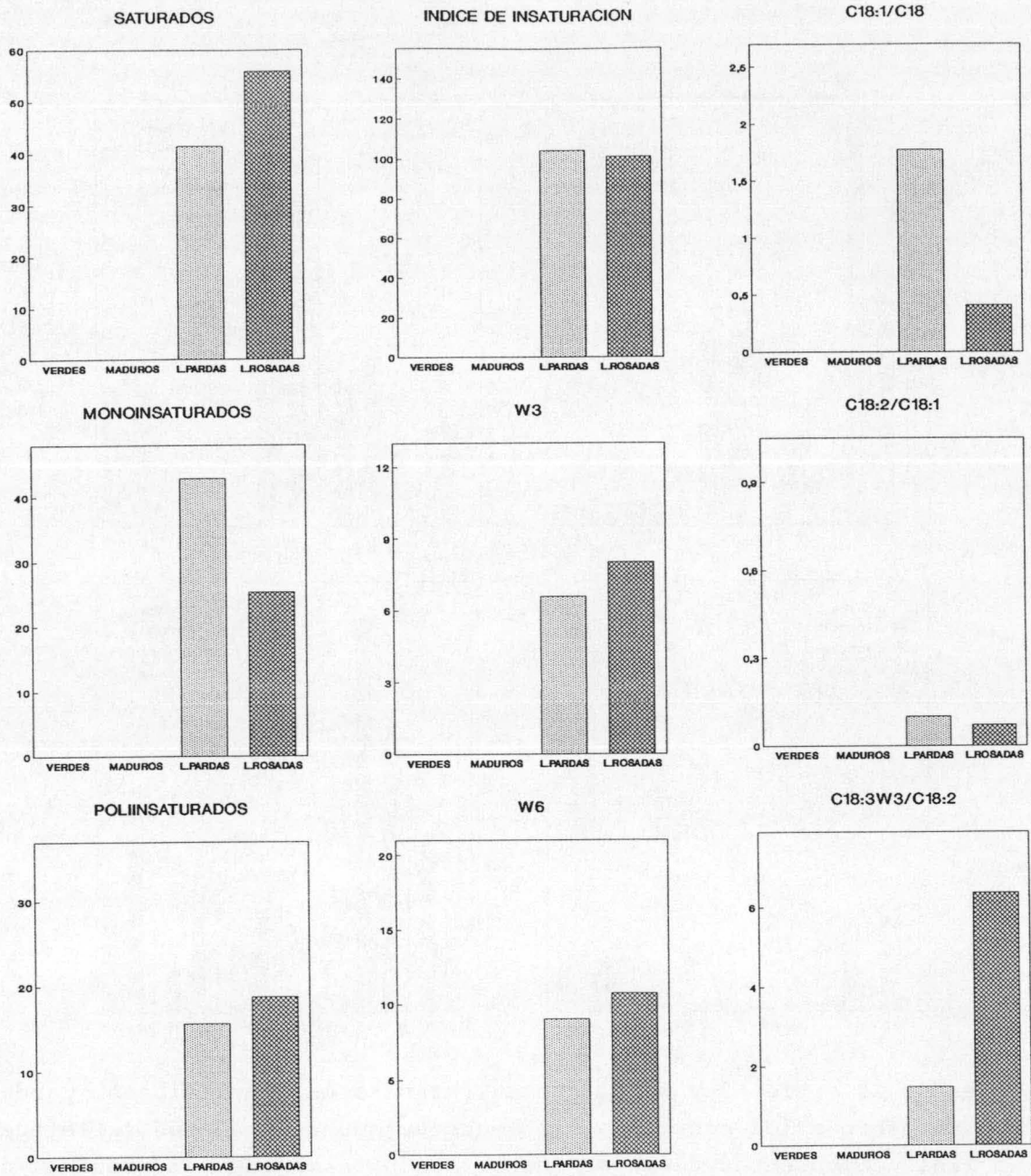
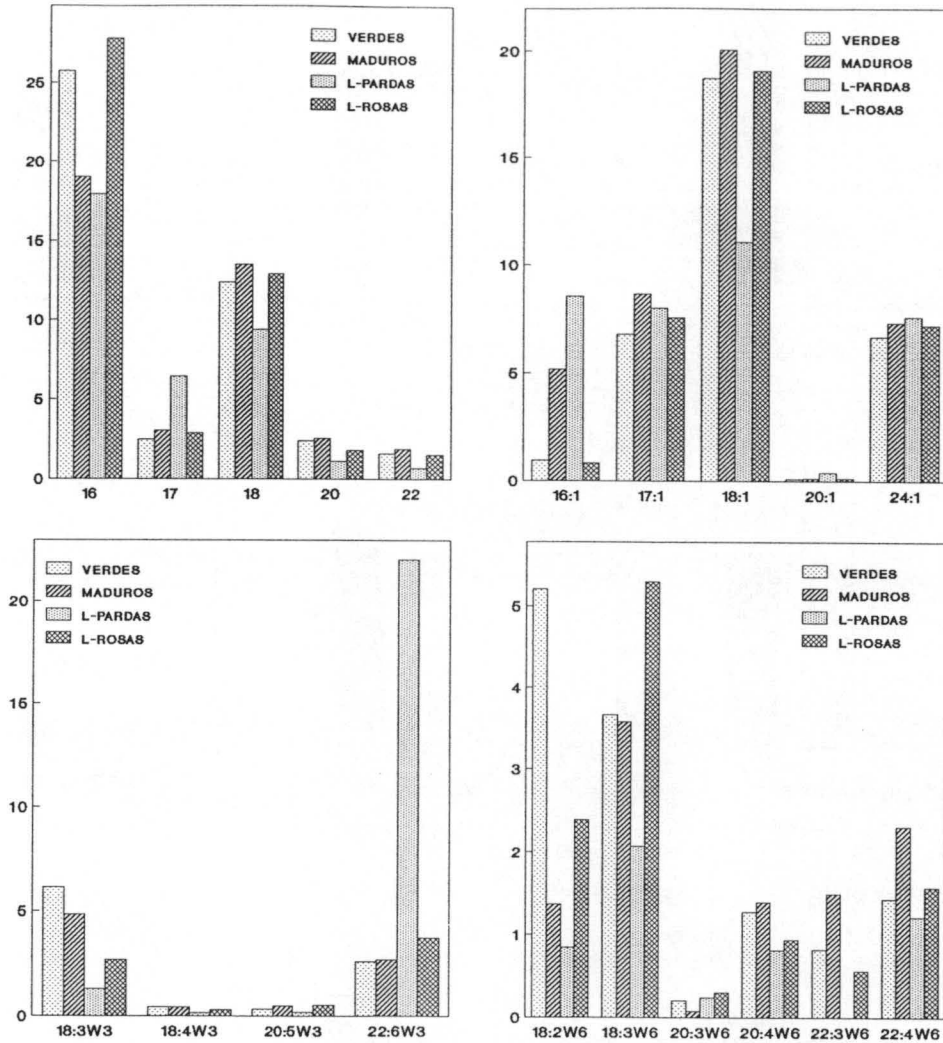


FIGURA 80.- Banda 10. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 10, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



tajes de la serie w3 y w6 no son muy grandes en las lesiones pardas con respecto a los controles, el hecho de que se vean más reflejadas en los componentes de mayor insaturación, hace que el índice de insaturación y el de poliinsaturados aparezcan ligeramente incrementados en el tejido lesionado.

Banda 10

Esta banda sólo se encuentra en los tejidos lesionados y es muy característica su apariencia. Al ser revelada con yodo aparece como una banda muy estrecha y una tonalidad amarilla más clara que el resto de las bandas. Es más abundante en las lesiones pardas. Su

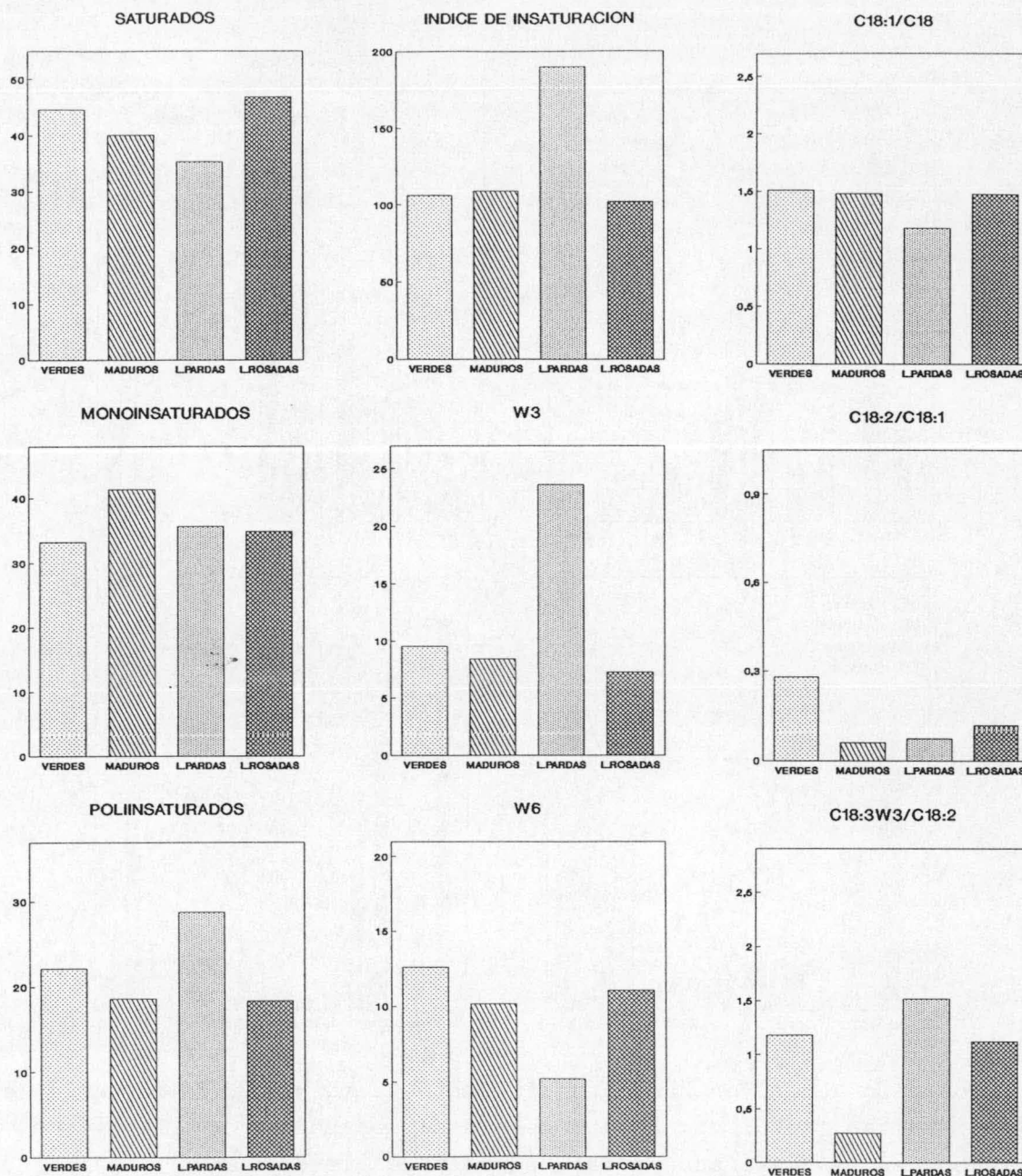
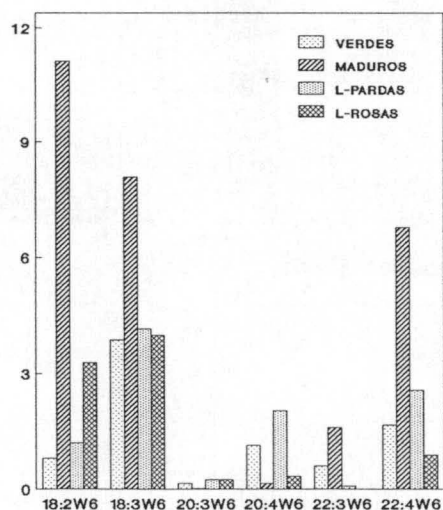
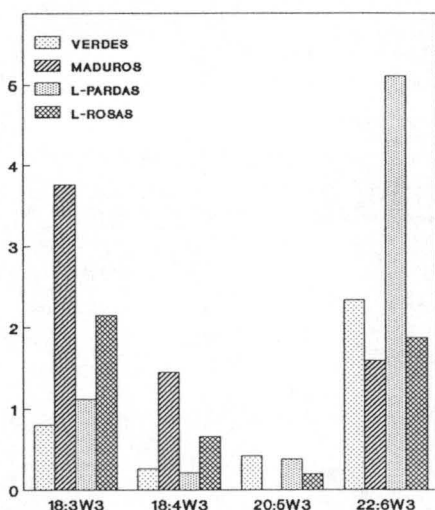
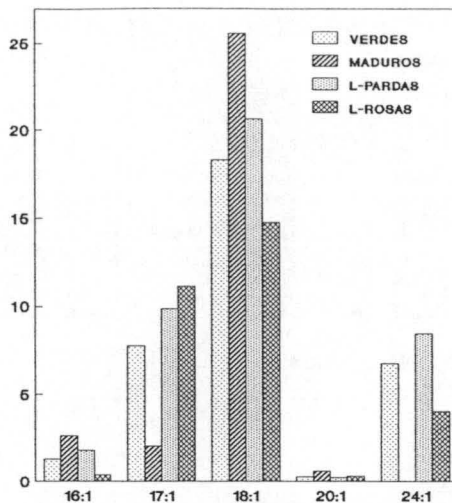
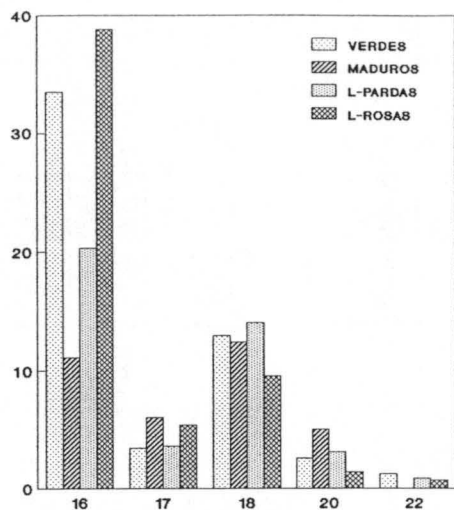


FIGURA 81.- Banda 11. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 11, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



composición en AG es bastante diferente, como puede observarse en los índices lipídicos. La abundancia de los ácidos palmitoléico y oléico en las lesiones pardas, es responsable de que el índice de Monoinsaturados se vea muy incrementado. La abundancia del C18:1 en la especie componente de este tejido también queda reflejada en la relación C18:1/18. Mientras que el alto valor encontrado en la relación C18:3/C18:2 en las lesiones rosadas es consecuencia del pequeño porcentaje que alcanza el C18:2w6, siendo el C18:3w6 el componente mayoritario de esta serie.

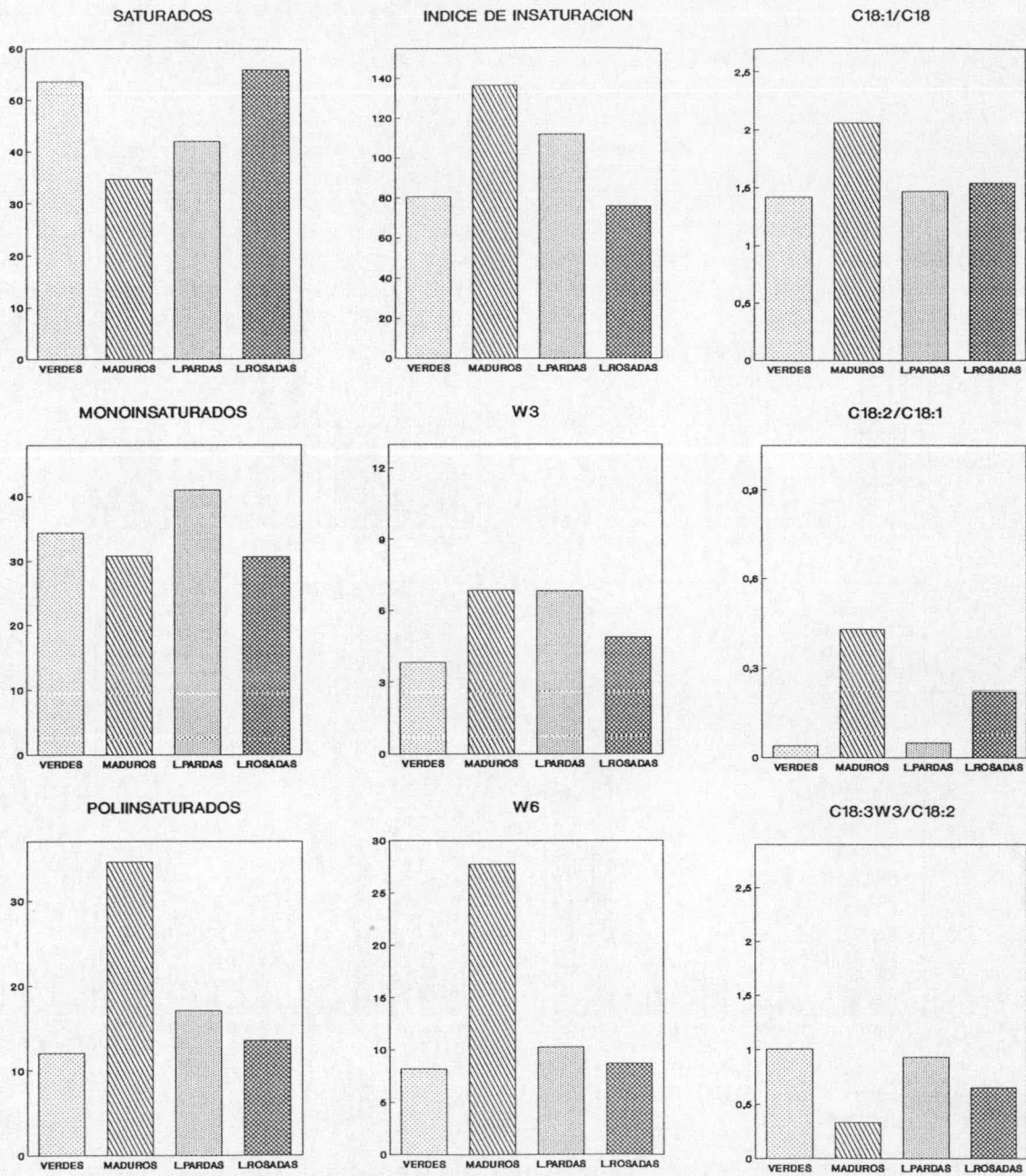
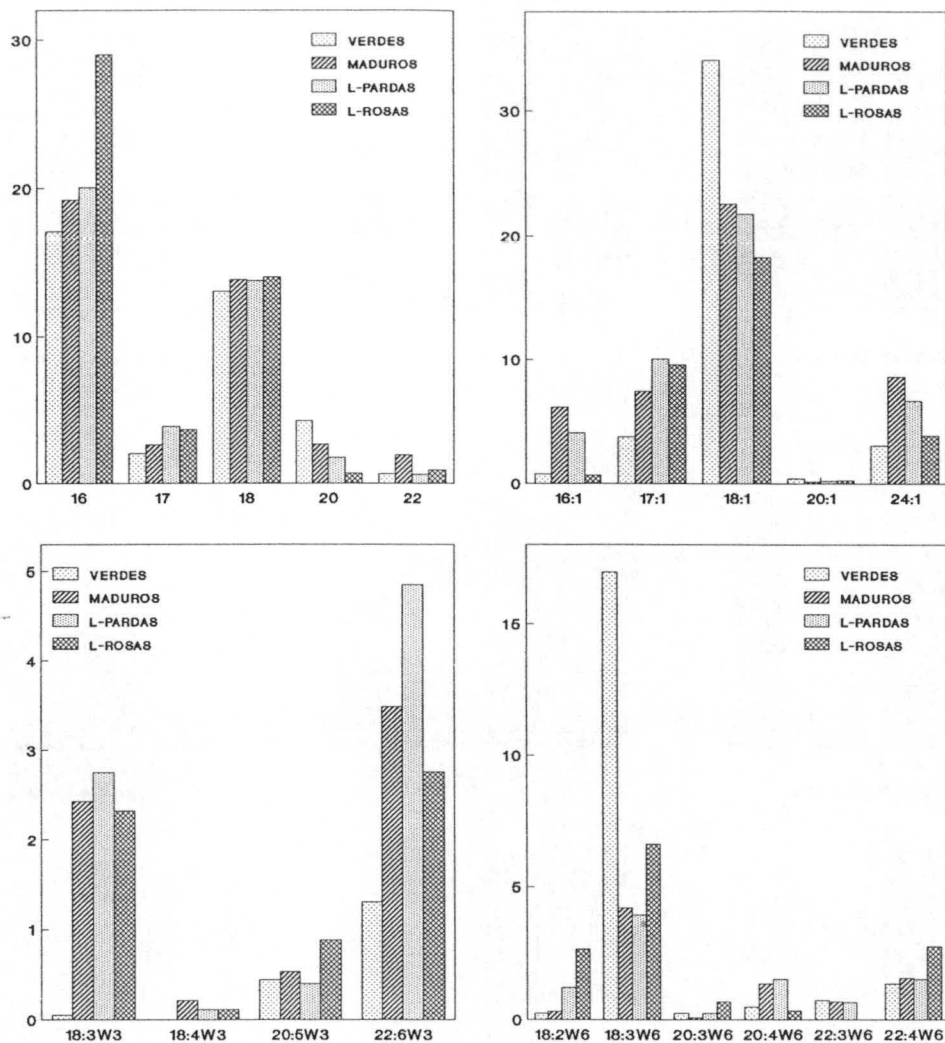


FIGURA 82.- Banda 12. Identificada como la fracción de fosfatidil-etanolamina. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 12, tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



Banda 11

Presenta menor importancia en las lesiones rosadas. En el estudio de los índices lipídicos destaca el comportamiento de las lesiones pardas con un % de W3 muy alto, que resulta de la abundancia con que participa el C22:6w3, superando el 20% del total de ácidos que componen esta especie, mientras que en el resto de las condiciones, los AG componentes de esta serie se encuentran escasamente representados, siendo el C18:3w3 el más abundante sin superar el 6% del total. Esta es también la causa de que el índice de insaturación y el de poliinsaturados sean más altos en este tejido. El incremento

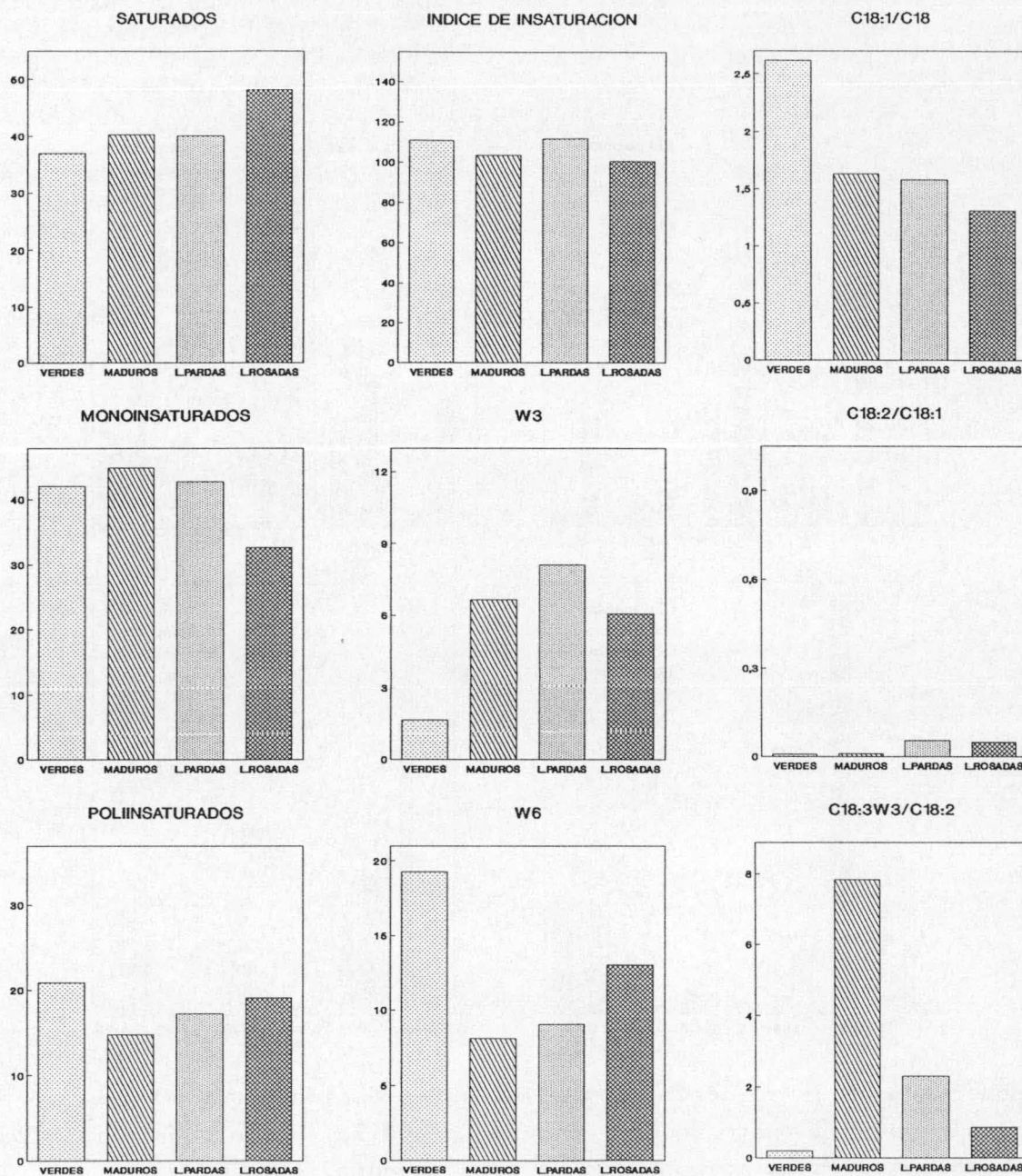
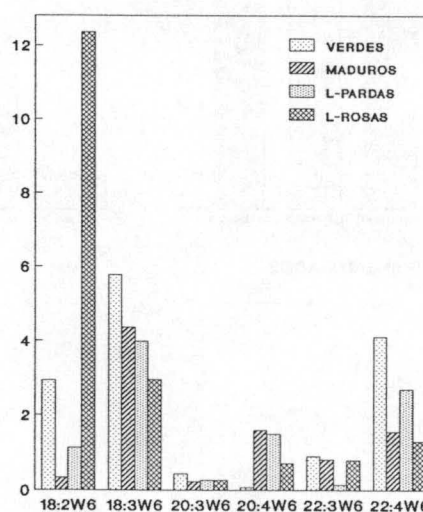
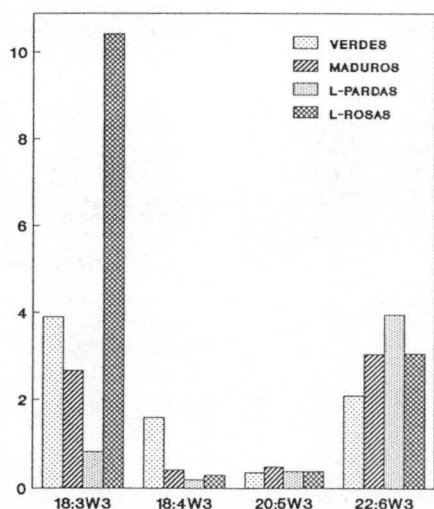
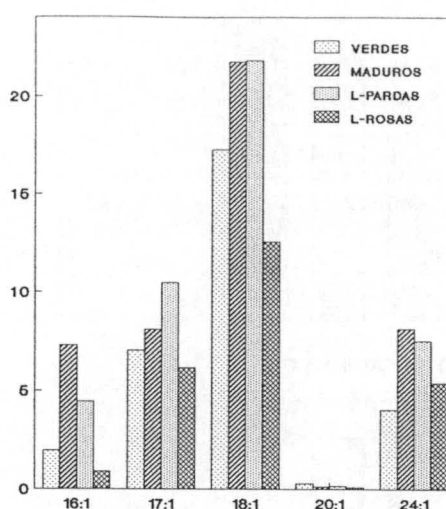
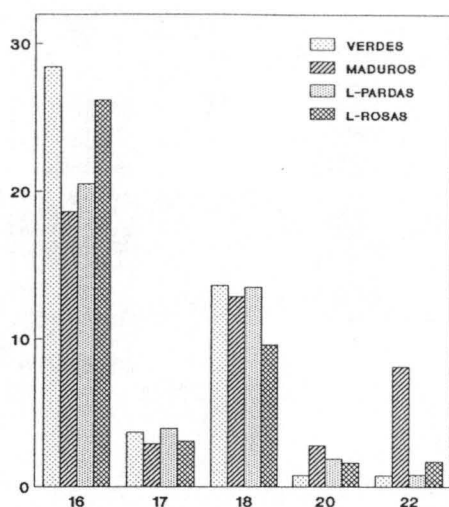


FIGURA 83. Banda 13. Correspondiente posiblemente a la fracción de sulfátidos. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 13 tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



observado en la relación C18:3w3/C18:2 es debido a que el C18:2w6 al igual que el resto de los componentes de la serie w6 participan escasamente en la composición de esta especie.

Banda 12

Esta banda sólo es detectada fotodensitométricamente en los tejidos lesionados. Sin embargo, en ocasiones aparecía también en los controles. Por este motivo se raspó la zona correspondiente de la placa, sin que fuese claramente patente la presencia de la banda y se procedió a su metilación obteniéndose un resultado positivo. Lo

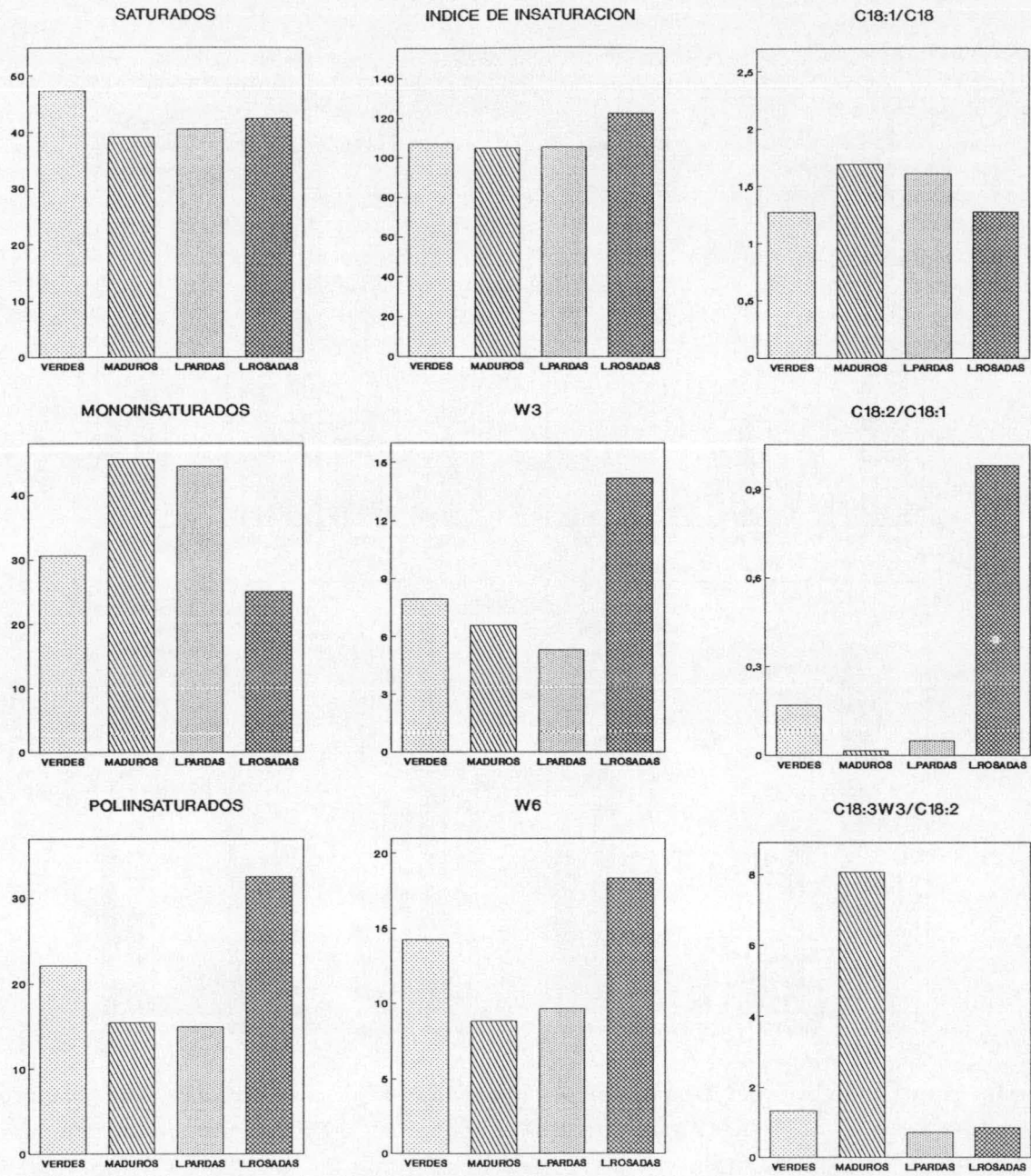
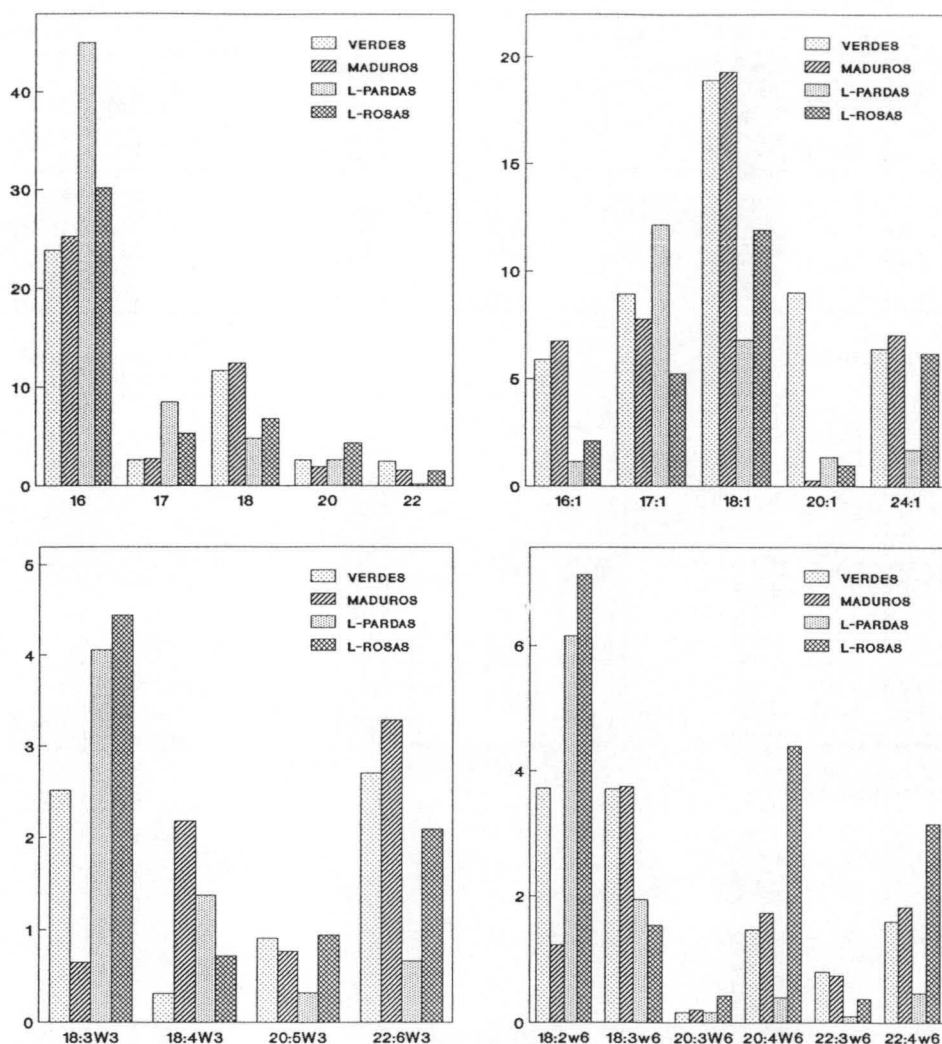


FIGURA 84. Banda 14. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 14 tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



más destacable es la reducción del ácido palmítico en los frutos maduros que se sitúa en un 11% frente al 39% encontrado en las lesiones rosadas. Los AG poliinsaturados de la serie w3 y w6 están pobremente representados en los frutos verdes, y en cambio tienen gran importancia en los frutos maduros.

El análisis de los índices lipídicos nos indica que la reducción en el % de Saturados en los frutos maduros va acompañada de un notable incremento en el índice de poliinsaturados, índice de Insaturación y % de W6 estando el % de W3 también incrementado frente a los frutos verdes. La abundancia del C18:2w6 es responsable del alto

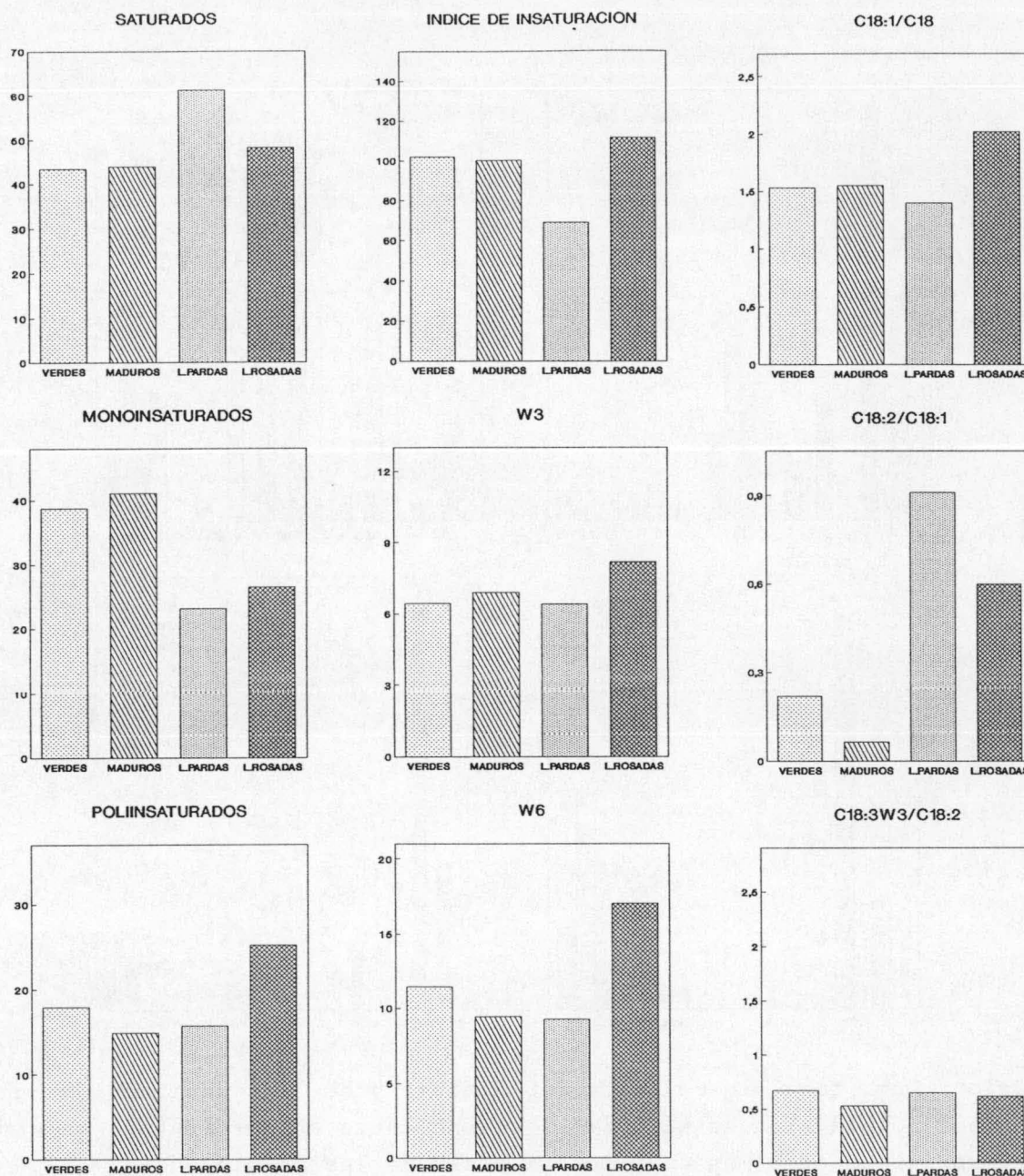
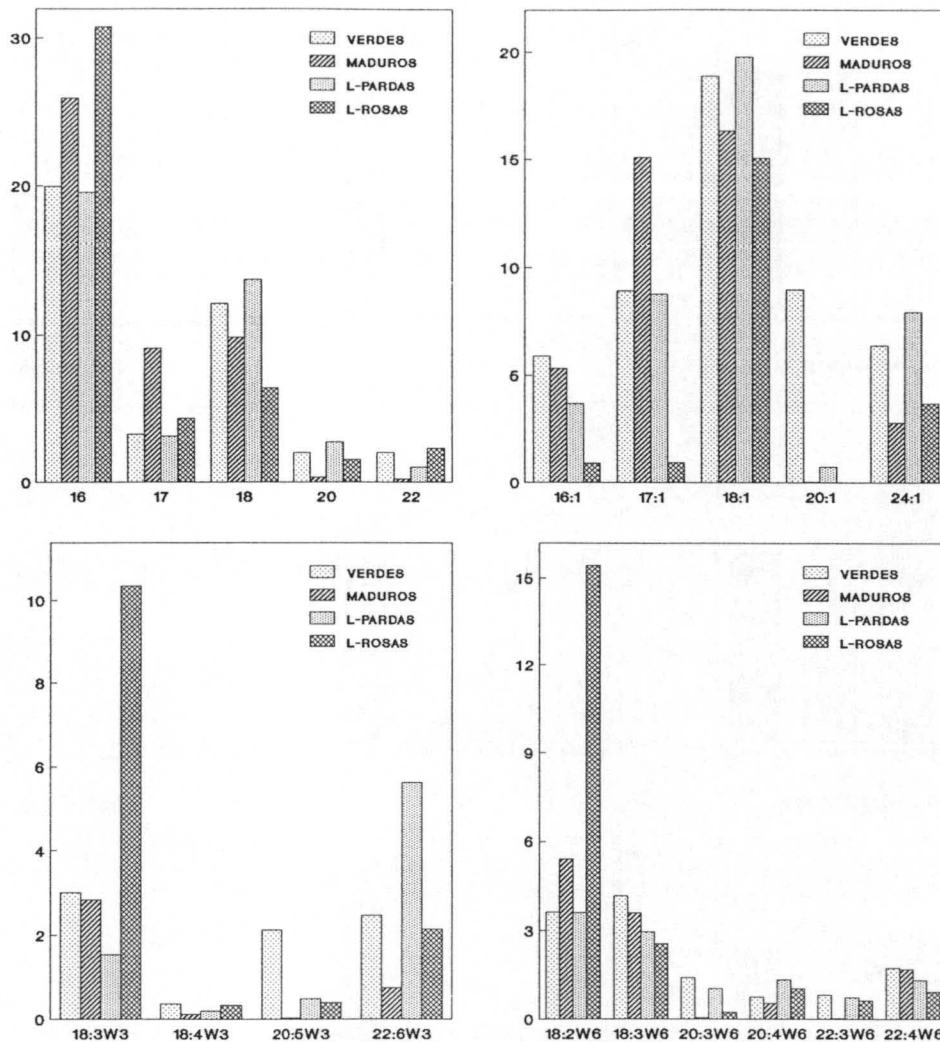


FIGURA 85.- Banda 15. Correspondiente posiblemente a una fracción de esteroides esterificados. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 15 tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.



valor que toma la relación C18:2/C18:1 y de la disminución del C18:3/ C18:2, aunque el C18:3w3 se encuentre en los frutos maduros en una proporción muy superior al resto de las condiciones.

Banda 13

Su abundancia es menor en las lesiones pardas. Su movilidad coincide con la de los sulfátidos empleados como patrón. El estudio de los índices lipídicos nos permite encontrar diferencias en el % de Saturados, que es más alto en las lesiones rosadas, ya que el palmítico participa en una mayor proporción en la especie de este

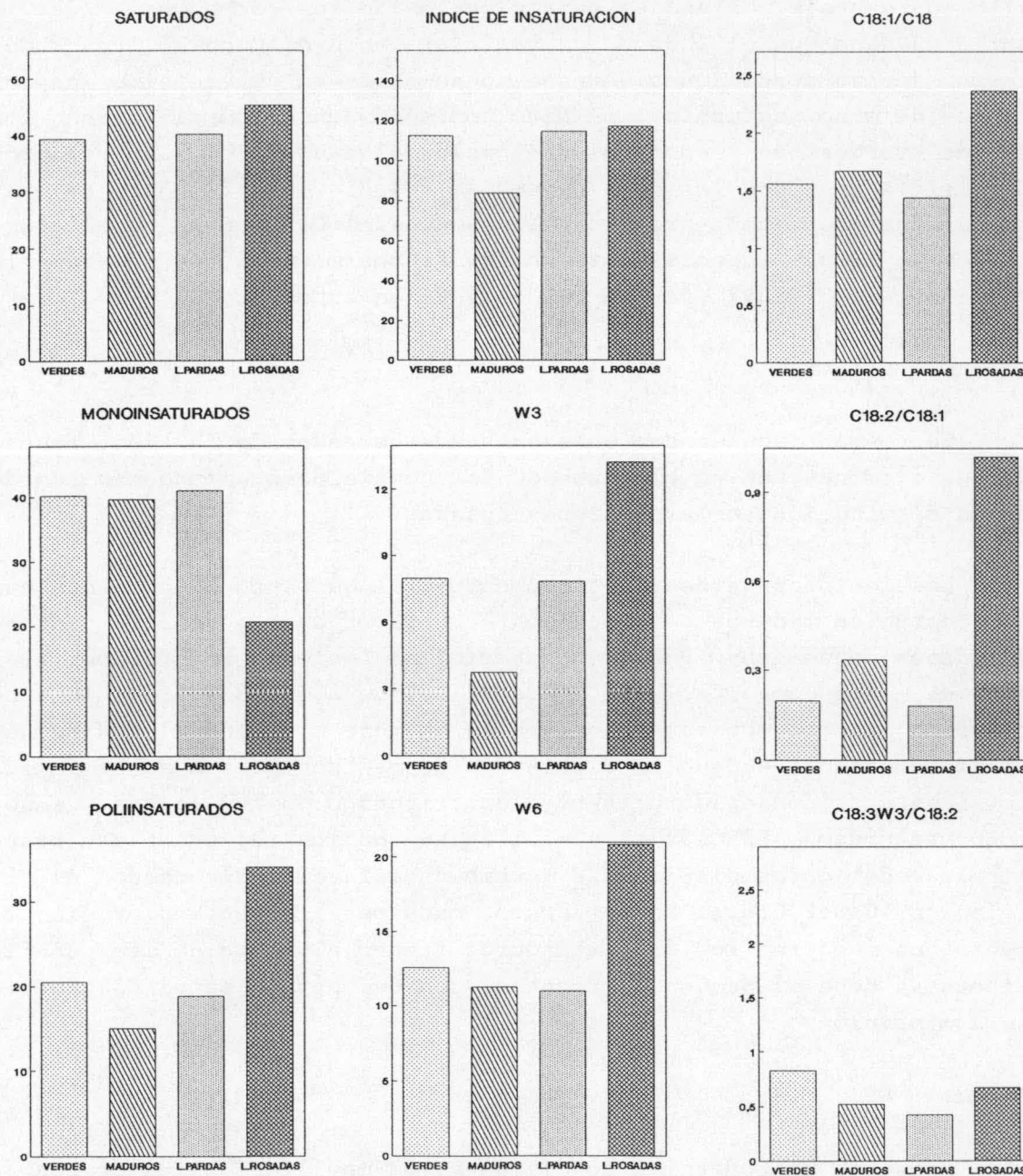


FIGURA 86.- Banda 16. Correspondiente posiblemente a una fracción de esteroides esterificados. Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de las series w3 y w6 (Página anterior) así como estudio de los índices lipídicos considerados en la banda cromatográfica nº 16 tras la separación en TLC -fase móvil polar- de extractos de mesocarpio de chirimoyas verdes, maduras y de tejidos dañados por almacenamiento en frío y traslado posterior a 22°C.

tejido que en los otros. También es destacable el % de W6 muy superior en los frutos verdes debido a que el C18:3w6 se encuentra en un alto porcentaje. La escasa participación de los componentes de la serie w3 hace que el % de W3 se vea claramente disminuido frente al resto de las condiciones. Aunque no se observan diferencias en el índice de monoinsaturados, el alto contenido en ácido oléico en los frutos verdes es responsable del valor alcanzado en la relación C18:1/18. En todas las condiciones la relación C18:2/C18:1 es muy baja, por la pequeña proporción presente del C18:2w6 en cualquiera de los tejidos, especialmente en los frutos maduros, por lo que la relación C18:3/C18:2 aparece muy elevada en estos frutos.

Banda 14

La mayor abundancia en esta banda corresponde a los frutos verdes disminuyendo en el resto de las condiciones siendo más acusada la disminución en las lesiones rosadas.

Las lesiones pardas muestran un perfil bastante coincidente con los controles maduros como podemos observar a través de los índices lipídicos estudiados. Por el contrario las lesiones rosadas se alejan de este comportamiento, presentando un % de W3 y % de W6 muy elevados y como consecuencia también aparece muy alto el índice de Poliinsaturados, aunque la diferencia no es tan marcada en el índice de Insaturación debido a la baja contribución de los ácidos grasos monoinsaturados. El C18:3w3 y el C18:2w6 son los responsables principales de estas diferencias y también del valor alcanzado en la relación C18:2/C18:1. En los frutos maduros el espectacular incremento que muestran los frutos maduros frente al resto de las condiciones se debe al pequeño porcentaje con que participa el C18:2w6 en su composición.

Banda 15

Presente en todas las condiciones. Su movilidad coincide con la de los esteroides esterificados. Es una banda que tiende a difundir ensanchándose en el plano. Cuando se revela con iodo aparece siempre con un contorno exterior mucho más intenso que el interior. Hemos visto que en el caso de los tejidos lesionados el interior se oxida rápidamente y presenta un color grisáceo.

En las lesiones pardas, el ácido palmítico participa con un 45% del total de los AG constituyentes de esta especie, frente al 25%

encontrado en los controles. Esto hace que el % de Saturados aparezca elevado en este tejido mientras que el % de Monoinsaturados está muy disminuido. Otra diferencia importante es el % de W6 en las lesiones rosadas, dado que todos los componentes de esta serie, pero especialmente el C18:2w6 y C20:4w6 están incrementados. Así mismo, en este tejido la relación C18:2/C18:1 resulta muy elevada no sólo por el alto contenido en C18:2w6 sino también por el bajo contenido encontrado en el C18:1.

Banda 16

Podría tratarse también de esteroides esterificados de distinta familia que los anteriores. Sólo los lípidos neutros alcanzan un Rf tan alto. Se encuentra presente en todas las condiciones y su abundancia es mayor en las lesiones rosadas.

Igual que en el caso anterior la abundancia del C18:2w6 y del C18:3w3 en las lesiones rosadas marca las diferencias más claras encontradas en los índices lipídicos de este tejido frente a los controles.

Como resumen podemos remitirnos a lo escrito más arriba, tras los comentarios sobre las bandas separadas con el líquido de desarrollo apolar.

Evidentemente existen discrepancias entre los resultados encontrados con ambos métodos. Quizás la más llamativa esté en la composición de los lípidos apolares.

Estos componentes apolares se ven incrementados en los tejidos dañados, especialmente en las lesiones rosadas, evidenciándose este resultado sea cual sea el método de separación empleado. Sin embargo, al estudiar la composición en ácidos grasos de estas fracciones hay discordancia según sea el método cromatográfico. En el primer caso el porcentaje en ácido palmítico era muy elevado, superando el 90% en muchos análisis. Esto no se obtiene cuando la separación se realiza con el segundo procedimiento.

Evidentemente, pese a que exista una clara separación en once o dieciseis especies lipídicas respectivamente, no podemos considerarlas como fracciones puras, por lo que es arriesgado extraer conclusiones definitivas de estos datos.

El problema se está abordando actualmente desde dos perspectivas diferentes. En primer lugar se está desarrollando un programa de ordenador para poder computar el gran volumen de datos numéricos, y poder establecer relaciones más precisas entre ellos. En segundo lugar, y dado que el problema principal radica en la falta de pureza de las fracciones lipídicas separadas, pensamos que debemos recurrir a métodos cromatográficos más precisos, por lo que se recurrirá a métodos de cromatografía líquida en columnas de sílice y a métodos de HPLC en fase reversa, así como a técnicas bidimensionales en capa fina. Resultados preliminares de esta última técnica se muestran en la Lamina I.

Una vez resuelto el problema de la separación, hay que proceder a la identificación de cada una de las fracciones. En este trabajo, ésto no se ha realizado con mayor precisión, debido a las dudas que se nos han planteado sobre la pureza de algunas de las fracciones utilizadas.

IV.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA

La maduración de los frutos va asociada a cambios en la textura y reblandecimiento del tejido. Varios mecanismos pueden estar implicados en el fenómeno de reblandecimiento. La degradación del almidón entre otros cambios puede tener alguna influencia, pero parece ser que la modificación de las paredes celulares es la causa principal del reblandecimiento. La destrucción y alteración de los sistemas de membranas es otro fenómeno que se produce en los procesos de senescencia y envejecimiento.

Por estos motivos realizamos un estudio de los cambios ultraestructurales sufridos por las chirimoyas a lo largo de la maduración y durante la conservación a bajas temperaturas. Para ello hemos elegido frutos verdes recién recolectados, frutos senescentes mantenidos 6 días a 22°C, frutos conservados 6 días a 4°C y por último frutos conservados 9 días a 4°C y mantenidos durante tres días mas a 22°C.

Para el análisis de los posibles cambios ultraestructurales se han elegido las siguientes zonas del fruto: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. En el epicarpio se han diferenciado dos zonas la capa más externa que corresponde a la piel verde y la capa colindante con

ésta, que contiene abundantes inclusiones minerales y que representa una región de transición entre epicarpio y mesocarpio.

Los daños por frío se manifiestan rápidamente en el epicarpio apareciendo zonas pardeadas. Por ese motivo se han analizado, en los frutos conservados a bajas temperaturas, zonas de epicarpio que tras el enfriamiento permanecían verdes y otras zonas que habían sufrido pardeamiento. La zona interna del epicarpio resulta afectada por el tratamiento a bajas temperaturas, apareciendo en este caso una capa entre 3 y 7 mm de color óxido y de textura acorchada que también fue objeto de análisis.

En el mesocarpio, los daños por frío se ponen de manifiesto por la aparición de vesículas rosadas que envuelven a las semillas y que hemos descrito anteriormente como "lesiones rosadas". Las lesiones pardas no han podido ser estudiadas por la dificultad que presentaba la preparación de la muestra al aparecer en frutos senescentes o envejecidos, encontrándose en zonas del mesocarpio completamente disueltas.

IV.5.1. CHIRIMOYAS VERDES

La observación de los cortes semifinos del epicarpio externo, (Láminas II y III), al microscopio óptico nos permite apreciar una primera capa de células aplanadas recubiertas por una capa cérica. Hacia el interior las células van adquiriendo formas poliédricas ligeramente redondeadas y, progresivamente, su tamaño aumenta. Las células aparecen casi vacías como consecuencia de la existencia de una gran vacuola central, quedando el citoplasma restringido a una franja estrecha en contacto íntimo con la pared. Los espacios intercelulares son muy pequeños. Se observan también conjuntos de células que se tiñen intensamente con azul de toluidina, que pueden ser células constituyentes de vasos conductores.

Al microscopio electrónico de barrido (M.E.B), podemos observar las capas de células exteriores más compactas, las paredes celulares aparecen rígidas y en el interior de algunas células se pueden encontrar depósitos minerales.

Con el microscopio electrónico de transmisión (M.E.T.), se

observan las paredes integras, apreciándose la lámina media como una línea nítida más electrodensa. Es frecuente la presencia de plasmodesmos o restos de estos a lo largo de la pared.

El espacio de separación entre la pared celular y el plasmalema es muy pequeño. Con la excepción de la gran vacuola central que ocupa casi todo el volumen intracelular, el citoplasma queda reducido a una estrecha franja que bordea toda la pared. En su interior se observan gran cantidad de orgánulos funcionales, como cloroplastos con doble membrana bien definida y abundantes grana en los que los tilacoides se encuentran perfectamente apilados. En su estroma se localizan pequeños gránulos de almidón de forma lenticular y numerosos plastoglobuli.

Las mitocondrias son muy abundantes. También contienen doble membrana y crestas muy aparentes.

Se encuentran estructuras membranosas semejantes al retículo endoplásmico liso, localizándose en las proximidades de mitocondrias y junto a grupos de dictiosomas, que aparecen separados. Sin embargo, a pesar del buen estado funcional en que se encuentran los orgánulos observados, aparentemente no existe una síntesis activa de proteínas, ya que no se observan ni ribosomas ni retículo endoplásmico.

La observación de los cortes semifinos del epicarpio interno (Lámina X) al microscopio óptico pone de manifiesto la existencia de numerosas inclusiones minerales que se tiñen intensamente con azul de toluidina.

Las células son también vacuoladas y el espacio entre el plasmalema y el tonoplasto queda restringido a una estrecha franja que contiene abundantes orgánulos. En estas células los cloroplastos están ausentes, aparecen amiloplastos que contienen granos de almidón, de forma ovoidal, en número de 3 a 7 y limitados por una membrana bien definida. Estos orgánulos se encuentran frecuentemente en las proximidades de núcleos y mitocondrias manteniendo un íntimo contacto entre sus membranas.

Las paredes presentan un aspecto semejante al descrito para las células del epicarpio externo, apreciándose claramente la lámina

media, y a lo largo de la pared se encuentran también plasmodesmos.

Se observan núcleos con doble membrana bien definida, y nucleolo, la cromatina aparece dispersa. Hay gran cantidad de mitocondrias con doble membrana y abundantes crestas, también se observan dictiosomas y vesículas secretoras.

La observación al M.O. de los cortes semifinos del mesocarpio (Lámina XV), permite observar células algo irregulares con notorios espacios intercelulares, en su mayoría rellenas de almidón en forma de amiloplastos intactos, aunque en algunas la membrana del amiloplasto ha desaparecido quedando los granos de almidón sueltos ocupando la casi totalidad de la célula.

Con el M.E.B. se obtiene la misma información, las células están repletas de almidón y podemos observar el amiloplasto rodeado por su membrana.

Las microfotografías obtenidas con el M.E.T nos permiten observar las paredes intactas, la membrana plasmática encierra un citoplasma con abundantes orgánulos, sobresaliendo la presencia de numerosos dictiosomas asociados y gran cantidad de vesículas, que pueden tener como misión la secreción de proteínas enzimáticas con distintas funciones en la fase final de la madurez fisiológica del fruto.

Las mitocondrias se encuentran intactas y funcionales y mantienen su doble membrana y gran cantidad de invaginaciones, aparecen también ribosomas asociados a retículo y en las proximidades del aparato de Golgi. Los núcleos provistos de nucleolo muestran la cromatina dispersa. Los gránulos de almidón alcanzan un tamaño de hasta 12 μm .

No se aprecian diferencias morfológicas entre el endocarpio y el mesocarpio (Láminas XX y XXI).

IV.5.2 CHIRIMOYAS MADURAS

Las chirimoyas tras permanecer 6 días a 22°C se encuentran completamente senescentes. Las células de los diferentes tejidos analizados se encuentran muy degradadas, siendo el endocarpio el

tejido que ofrece más resistencia. No debe existir funcionalidad alguna en los orgánulos que aún permanecen en el citoplasma. En ninguna de las preparaciones se han visualizado núcleos, retículo endoplásmico, ribosomas asociados o libres, así como tampoco ha sido posible encontrar ni dictiosomas ni vesículas de secreción.

Al microscopio óptico, pueden observarse las células del epicarpio interno con abundante contenido disperso en su interior. Ha desaparecido la continuidad de la membrana plasmática y el material antes localizado entre el plasmalema y el tonoplasto se encuentra disperso.

Al M.E.B. se observa cómo las paredes celulares han perdido rigidez y aparecen rodeadas de gran cantidad de material amorfo.

Con el M.E.T. podemos observar las paredes altamente degradadas, la región correspondiente a la lámina media aparece disuelta y el material fibrilar constituyente de la pared primaria aparece desintegrado. Las fibras que perduran no tienen una estructura definida mostrando un aspecto sinoidal. Todavía se encuentran plasmosdesmos, lo que induce a pensar que el material que constituye este complejo es resistente a la acción de pectinasas, celulasas y otros enzimas líticos capaces de disolver la lámina media y la pared primaria. En la zona disuelta, ocupada antes por la lámina media, se encuentran acúmulos de material de deshecho muy electrodensos. Entre las fibras de la pared se visualizan pequeños puntos muy osmiófilos.

El plasmalema se encuentra totalmente degradado. No se han encontrado cloroplastos, ni tampoco mitocondrias, aunque sí aparecen orgánulos muy desorganizados rodeados de doble membrana. Presumiblemente serían restos de mitocondrias ya que está descrito que los cloroplastos se degradan con anterioridad.

Con el M.E.B. podemos ver que las células del epicarpio interno (Lámina XI), aparecen vacías de contenido, se ha perdido la rigidez de las paredes y junto a posibles inclusiones minerales aparece gran cantidad de material amorfo.

Con el M.E.T. observamos las paredes muy degradadas. La lámina media está completamente disuelta y las fibras de celulosa que aún

no han sufrido degradación no mantienen una estructura definida, mostrando un aspecto sinuoso. Los gránulos osmiófilos muy abundantes no sólo bordean la pared sino que se encuentran inmersos entre las fibras de celulosa, si bien el acúmulo es mucho más denso del lado citosólico.

El citoplasma aparece muy denso y está muy desorganizado. Se observan acúmulos membranosos en las proximidades de la pared y en ocasiones pueden producirse fenómenos de exocitosis protagonizados por la membrana o por restos de esta.

En este grado de desorganización aún persisten mitocondrias que conservan su doble membrana aunque las invaginaciones de la membrana interna son escasas. Los amiloplastos están ausentes.

Los cortes semifinos del mesocarpio, (Lámina XVI) observados al microscopio óptico y teñidos con azul de toluidina, presentan muy poco contraste por lo que no se incluye ninguna fotografía. Se puede observar que las paredes están rotas, teniendo formas poliédricas-redondeadas completamente vacías. No hay ningún amiloplasto visible, ni tampoco otras estructuras citoplasmáticas.

Con el S.E.M se observa que las células del mesocarpio están vacías, pudiendo quedar algunos granos de almidón de tamaño muy pequeño. Las paredes han perdido rigidez.

Al T.E.M aparecen numerosas estructuras cerradas con doble membrana, que se encuentran en las proximidades de mitocondrias y plastidios o aisladas en el citoplasma, su aspecto recuerda el de los proplastidios. Sin embargo no es probable que en este estadio de la maduración se encuentren estos orgánulos intactos, siendo más probable que se trate de la membrana de plastidios adultos que en el proceso de degeneración han perdido el contenido de su matriz y quedan como residuos de membranas en el citoplasma. En las proximidades de estas estructuras es posible encontrar granos más osmiófilos que podrían ser gotículas lipídicas.

Las mitocondrias pueden encontrarse todavía provistas de doble membrana, aunque con un número muy reducido de crestas, pero también pueden observarse otras en estado mucho más desorganizado.

La pared aparece muy poco densa, lo que indica que se ha

producido una digestión del material fibrilar que la constituye, celulosa y pectina principalmente. La lámina media se encuentra parcialmente disuelta, no aparece continua, pero es posible aún detectar su localización anterior.

En las células del endocarpio (Lámina XXI) es posible todavía encontrar algunos granos de almidón. Salvo esto, su estado es análogo al descrito para el mesocarpio aunque aquí no ha sido frecuente la observación de estructuras membranosas.

IV.5.3. CHIRIMOYAS CONSERVADAS A 4°C

En las zonas del epicarpio externo que conservan el color verde (Lámina V) después de haber permanecido 6 días a 4°C, no se observa ni degradación de las paredes, que permanecen intactas, ni disolución de la lámina media, que es perfectamente visible. La vacuola central permanece igual que en el caso de los frutos verdes. El plasmalema es continuo.

Las mitocondrias conservan su doble membrana y sus crestas son muy aparentes, lo que denota que pueden tener una actividad intensa. En las proximidades de las mitocondrias pueden observarse pequeñas vesículas membranosas con apariencia de retículo endoplásmico. También se aprecia la existencia de ribosomas. Los cloroplastidos contienen abundantes gránulos de almidón y los grana son muy reducidos pero aparentemente su organización tilacoidal es normal. Dentro de estos orgánulos aparecen grandes acúmulos típicos de proteínas.

Por el contrario, las zonas del epicarpio que han sufrido pardeamiento, muestran al microscopio óptico que las células tienen un contenido central denso (Lámina VI).

Se comprueba con el M.E.T. que tanto las membranas de cloroplastos como de mitocondrias han perdido continuidad. Los cloroplastos aparecen hinchados y los grana comienzan a desapilarse. En las mitocondrias el número de crestas ha disminuido notablemente y muestran signos de hinchamiento.

La lámina media sigue apareciendo como una zona muy

electrodensa y las paredes no muestran signos de degradación, pero en sus contornos van apareciendo acúmulos de material amorfo y muy osmiófilo. En algunas zonas el material fibrilar que compone la pared presenta ondulaciones.

En el mesocarpio, la pared mantiene la estructura fibrilar y en sus proximidades se depositan cuerpos muy electrodensos. En ocasiones, el interior de la pared muestra zonas más osmiófilas y es posible encontrar restos de plasmodesma. El citoplasma es muy denso, contiene gran cantidad de mitocondrias y plastidios, junto a los que se asocian sistemas de membranas, gotas lipídicas y plastoglobuli.

IV.5.4 CHIRIMOYAS CONSERVADAS 9 D.T.R. A 4°C Y TRASLADADAS A 22°C.

Con el M.E.T. se observa una drástica desorganización de los cloroplastos, la membrana está rota, los grana se han desapilado y los tilacoides adoptan disposiciones aleatorias. De la matriz del cloroplasto se han liberado grandes acúmulos de proteínas. En la matriz de los plastidios abundan los plastoglobuli, que son de menor tamaño y menos osmiófilos que los encontrados en plastidios juvenes, fenómeno descrito para los tejidos envejecidos (Lámina VII).

Junto a los sistemas membranosos aparecen pequeños acúmulos de material muy duro, que no puede ser cortado con el ultramicrotomo y salta de la preparación dejando agujeros vacíos.

Las mitocondrias son escasas, presentan pocas crestas.

El citoplasma aparece invadido de sistemas membranosos y tanto en la pared como en la membrana, ocasionalmente, se observan pequeños depósitos de material amorfo y electrodense.

En la zona pardeada (Láminas VIII Y IX), los daños son mucho más acusados. Con el microscopio óptico podemos ver las capas de células externas llenas de inclusiones pardas, posiblemente depósitos de polifenoles. En algunas células se ha producido una retracción de la vacuola quedando un gran espacio entre el plasmalema y la pared, también se puede observar en las células más internas gran cantidad de almidón. Esta observación se ratifica con el M.E.B donde las

capas exteriores de células se encuentran empaquetadas y rellenas de material. Hacia el interior las paredes celulares no parece que hayan perdido rigidez.

Con el M.E.T se comprueba como la pared permanece sin degradarse, la lámina media sigue siendo visible y los acúmulos osmiófilos de material amorfo se hacen más frecuentes y voluminosos. Los plasmodesmas siguen estando presentes.

El contenido del citoplasma está muy degradado y aparece enmarañado en las proximidades de la pared. Frecuentemente el plasmalema aparece roto, otras veces se encuentra bordeando la pared de forma discontinua y en ocasiones se encuentra alejado de ésta. Las mitocondrias, escasas, han perdido funcionalidad.

Con el M.E.B. podemos ver que las células aparecen vacías de contenido, se ha perdido la rigidez de las paredes y junto a posibles inclusiones minerales aparece gran cantidad de material amorfo.

Con el M.E.T. observamos las paredes muy degradadas. La lámina media está completamente disuelta y las fibras de celulosa que aún no han sufrido degradación no mantienen una estructura definida, mostrando un aspecto sinuoso. Los gránulos osmiófilos, muy abundantes, no sólo bordean la pared sino que se encuentran inmersos entre las fibras de celulosa, si bien el acúmulo es mucho más denso del lado citosólico.

El citoplasma aparece muy denso y está muy desorganizado. Se observan acúmulos membranosos en las proximidades de la pared y en ocasiones pueden producirse fenómenos de exocitosis protagonizados por la membrana o por restos de ésta.

En este grado de desorganización aún persisten mitocondrias que conservan su doble membrana aunque las invaginaciones de la membrana interna son escasas. Los amiloplastos están ausentes.

Al microscopio electrónico de barrido se observa igualmente una gran desorganización, posibles inclusiones minerales, y material amorfo de estructura arborescente.

El endocarpio se encuentra también en una fase avanzada de

degradación. La pared aparece parcialmente disuelta y la región correspondiente a la lámina media se encuentra ocupada por un depósito continuo a modo de cordón de pequeños granos osmiófilos. Este material también se encuentra depositado bordeando las paredes por el lado opuesto al citosol. Se observa en algunas células una retracción de la membrana que permanece intacta, aunque se ha producido vesiculación. El citoplasma está ocupado por granos de almidón que aparecen rodeados por una fina capa de material osmiófilo. Los plastidios están muy degradados, ya no muestran continuidad en su doble membrana aparecen hinchados y los tilacoides están totalmente desordenados. Las mitocondrias aún mantienen su doble membrana, pero sus crestas son muy escasas. Restos de membranas y plastoglobuli están también presentes en el citoplasma.

Las mitocondrias son escasas y el número de crestas ha disminuido apreciablemente. En ocasiones se observa un hinchamiento de estos orgánulos con gran vesiculación de sus crestas y la doble membrana deja de ser continua.

La pared no se encuentra muy degradada aunque las fibras que la constituyen aparecen muy laxas y el espacio ocupado por la lámina media comienza a llenarse de gotículas lipídicas que también se encuentran en el espacio entre el plasmalema y la pared, que en ocasiones aparece muy electrodenso. No obstante, todavía es posible ver la lámina media. Frecuentemente la membrana plasmática está ausente y cuando se encuentra puede observarse como una estrechísima banda muy alejada de la pared o bien bordeando la pared de forma discontinua y mostrando frecuentes fenómenos de exocitosis. Ocasionalmente adosados a la membrana se encuentran depósitos electrodensos como los que acompañan a la pared.

En el mesocarpio, al igual que en el epicarpio, aparecen incrustaciones minerales que podrían ser cristales de oxalato cálcico.

La pared no se encuentra muy digerida, pero se observan abundantes fenómenos de exocitosis protagonizados por la membrana plasmática.

Se observan abundantes núcleos que incluyen nucleolo con vacuola central, pero la cromatina aparece muy condensada, las mitocondrias han perdido las crestas y su membrana también aparece deteriorada y aunque aparece algún grupo de dictiosomas aislados no parece

que exista ninguna funcionalidad de los orgánulos

Los amiloplastos en forma de granos compuestos están intactos y la membrana tiene un aspecto más osmíilo tal vez como consecuencia del material lipídico asociado a la membrana.

IV.5.5 LESIONES

En la capa interna del epicarpio se aprecia una zona de aspecto acorchado, muy deshidratada (Lámina XIV). Al microscopio óptico esta zona aparece constituida por células irregulares muy apiladas, apenas existen espacios intercelulares y en su mayoría llenas de granos de almidón. Con el S.E.M. se observan zonas en las que las paredes están más deterioradas y en general las células aparecen con abundante contenido de almidón. Al igual que en el resto de los tejidos procedentes de los frutos que han sido conservados a 4°C y posteriormente trasvasados a 22°C, el grado de deterioro sufrido por la pared es inferior al que presentan las membranas. Es posible encontrar abundantes sistemas membranosos dispersos en el citoplasma y vesículas que llevan adosadas pequeños, este conjunto presenta semejanza con el retículo endoplásmico rugoso con ribosomas asociados.

LESIONES ROSADAS

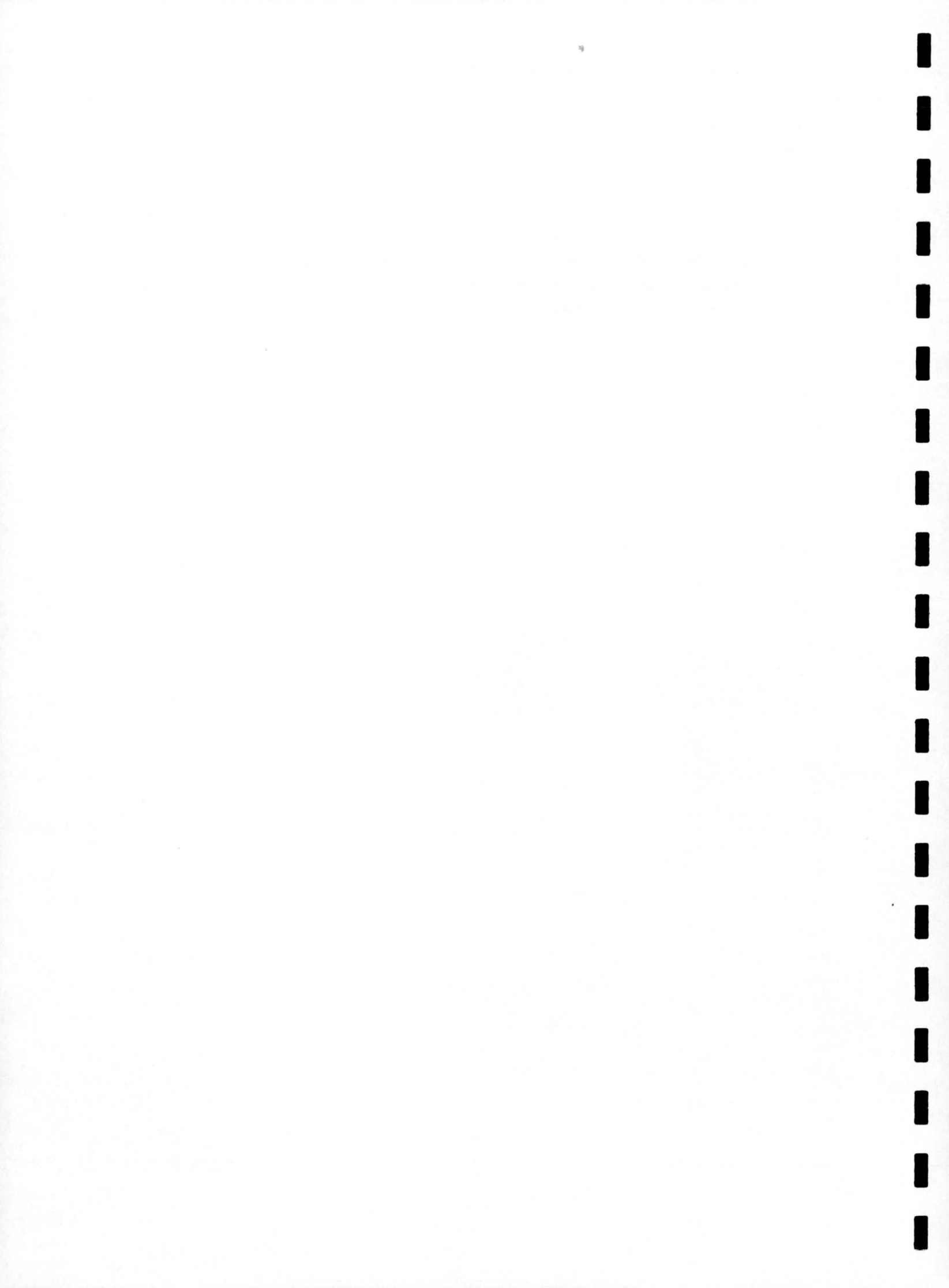
Al microscopio óptico, las células que constituyen las lesiones rosadas (Lámina XXV), muestran gran irregularidad en tamaño y forma y se encuentran totalmente llenas de granos de almidón (Lámina XXV).

Al SEM podemos observar que las células tienen un alto contenido en almidón. En algunas zonas, los amiloplastos conservan aún su membrana, presentan forma esférica y están formados por granos de almidón compuestos, observándose un empaquetamiento de los granos en el amiloplasto más denso que en otros tejidos, lo que podría ser consecuencia de la fuerte deshidratación sufrida en este tejido.

Con el M.E.T se pueden observar las paredes sin digerir pero contorneadas por depósitos electródensos a modo de cordón que bordea toda la pared. Existen amplias zonas de separación entre las células y el espacio intersticial se encuentra también ocupado por material

osmiófilo. La membrana plasmática se encuentra completamente degradada, los amiloplastos han perdido también su membrana y los granos de almidón libres se encuentran intactos flotando en el espacio celular.

Se ven abundantes acúmulos lipídicos, procedentes de la degradación de plastidios y otros cuerpos menos electrodensos de tamaño considerable que podría tratarse de plastoglobuli. No se observa ningún orgánulo funcional.



V. DISCUSSION



DISCUSION

La temperatura es un parámetro físico del que en gran medida depende el desarrollo normal de los seres vivos. En todas las especies biológicas conocidas existen rangos extremos, que pueden ser variables de una especie a otra, incompatibles con la vida.

Los seres vivos se han desarrollado y evolucionado en medios acuosos líquidos. El agua cumple un papel básico en el mantenimiento de las estructuras biológicas.

Las macromoléculas, proteínas, ácidos nucleicos, polisacaridos, mantienen sus conformaciones estructurales por la suma de toda una serie de interacciones débiles, entre las que cabe destacar las interacciones por puentes de hidrógeno, electrostáticas y las hidrofóbicas. Todas ellas dependientes en mayor o menor medida del agua y de la temperatura (Gutfreund, 1972; Dixon *et al.*, 1979).

Cualquier modificación en la temperatura, que se extienda más allá del rango permitido para cada especie biológica, debe tener consecuencias inmediatas en la conformación de las macromoléculas que debe afectar a su funcionalidad. Estas alteraciones en el caso de las proteínas pueden modificar, entre otros, los centros activos, centros reguladores, al igual que los centros de interacción con las hormonas en los receptores hormonales.

Además, no se puede olvidar el papel que la temperatura desempeña en las reacciones químicas, ya sean catalizadas o no.

La vida no está basada en la coexistencia de una serie de moléculas, cada una con unas propiedades específicas, sino que de la interacción entre diferentes especies moleculares van surgiendo propiedades nuevas que favorecen el desarrollo de los procesos vitales. Podemos pensar en las membranas celulares que surgen de la asociación de moléculas lipídicas y proteínas para constituir barreras con permeabilidad selectiva, que posibilitan las separaciones entre unas células y otras, siendo la base de la compartimentación intracelular en los organismos eucarióticos.

La correcta regulación del metabolismo depende, en gran medida,

de la compartimentación ya que posibilita la estricta regulación de la concentración de macromoléculas, metabolitos e iones en cada orgánulo o compartimento intracelular, para que en cada uno se pueda desarrollar el metabolismo adecuado, de cuya integración resulta el fenómeno vital.

El funcionamiento de las membranas depende, igualmente, de la temperatura. El modelo de mosaico fluido (Singer y Nicolson, 1972) explica la funcionalidad de las mismas. Las bicapas lipídicas deben estar en estado fluido para permitir la movilidad de otros componentes, cuyas interacciones específicas o cambios conformacionales permiten el adecuado control de los procesos de transporte y demás fenómenos metabólicos o fisiológicos asociados a las membranas.

Una disminución en la temperatura puede provocar una transición de fase en las bicapas lipídicas, que pasarían de un estado cristalino-líquido, en el que las cadenas hidrocarbonadas tienen libertad de giro alrededor de los enlaces carbono-carbono, a un estado de gel ordenado en el que las cadenas hidrocarbonadas adoptan conformaciones trans a modo de varillas rígidas.

La temperatura de transición de fase es muy variable de unos tipos de membrana a otros, dependiendo tanto de la proporción entre los distintos fosfolípidos, de la longitud de cadena y grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes y del contenido y tipo de esteroides.

Un alga verde-azulada - Anacystis nidulans - ha sido usada para estudios sobre la determinación de las temperaturas de transición. Cuando se hace crecer a 38°C, los lípidos de su membrana externa contienen fundamentalmente cadenas saturadas de 16 átomos de carbono, formándose estructura de gel ordenado a temperaturas inferiores a 14°C (Murata, 1984). Más o menos coincidente con esta temperatura las células comienzan a liberar grandes cantidades de electrolitos al medio extracelular (Ono et al., 1983), lo que produce la muerte.

En membranas de plantas superiores parece difícil que se produzcan transiciones de fase en membranas por encima de 0°C, ya que en su composición entran suficientes ácidos grasos poliinsaturados, como para evitarlo (Quinn y Willians, 1983), sin embargo se ha demostrado que aunque la membrana completa no sufra transición de fase hasta llegar a temperaturas muy bajas, existen algunas especies lipídicas en plantas tropicales que sí pueden sufrir transiciones de

fase a temperaturas superiores (Murata y Yamaya, 1984; Kenrick y Bishop, 1986), entre las que destacan el fosfatidil glicerol.

Por otra parte, las estructuras citoplásmicas de todos los vertebrados descansan sobre una red de proteínas fibrosas que constituyen el citosqueleto (Birchmeier, 1984). Estas proteínas son fundamentalmente de dos tipos: Filamentos de actina y filamentos de tubulina. Ambas son estructuras dinámicas que regulan los movimientos protoplásmicos, el movimiento de cromosomas durante la mitosis, el desplazamiento de orgánulos, el movimiento de cilios y flagelos y, en definitiva, el mantenimiento de la estructura de la célula.

Desde hace tiempo se conoce que los microtúbulos de las plantas pueden ser afectados por el frío (Inoue y Sato, 1967). Tanto los filamentos de tubulina (Morejohn y Fosket, 1982) como los de actina (Hochachka y Somero, 1984) se desagregan o disocian por el frío, ya sea su procedencia de animales o de vegetales, ya que existen muchas similitudes entre ellos (Dawson y Lloyd, 1987).

La asociación de las tubulinas está estabilizada por interacciones hidrofóbicas, que se hacen más debiles conforme se disminuye la temperatura. Está claramente demostrado que existen adaptaciones a la temperatura en el comportamiento de los microtúbulos, disminuyendo la concentración crítica de tubulina en especies adaptadas a vivir a bajas temperaturas (Juniper y Lawton, 1979; Willians et al., 1985).

Igualmente los filamentos de actina son sensibles a las bajas temperaturas (Patterson et al., 1979), estableciendose grandes diferencias entre especies adaptadas a vivir a bajas temperaturas, en las que no se produce una disrupción tan severa como la que tiene lugar en plantas tropicales (Woods et al., 1984a).

Tanto la actina como la tubulina se asocian a diferentes proteínas que actúan controlando su grado de polimerización. Una de estas proteínas podría ser la calmodulina. Se ha demostrado que el calcio promueve la disociación de los microtúbulos y la detención de los movimientos protoplásmicos (Minorsky, 1985). Una elevación por encima de los niveles normales en citoplasma, del orden de 0,1-1 μ M, podría tener un efecto drástico en la estructuración del citosqueleto. Debido a que las concentraciones mitocondriales y extracelulares de calcio son del orden de 1mM, una disminución en la

actividad de la ATPasa dependiente de calcio en respuesta a cambios en la temperatura (Caldwell y Haug, 1981) o la apertura de canales de calcio (Hanson et al., 1986) pueden ser responsables de una elevación en los niveles citosólicos de calcio iónico. Se ha demostrado que existe una salida progresiva de calcio en membranas de tomates cuando la temperatura se reduce por debajo de 15°C, sin embargo en membranas de *Digitalis purpúrea*, adaptada a temperaturas cercanas a 0°C esto no se produce (Woods et al., 1984b).

Está suficientemente demostrado que el crecimiento de plantas tropicales o subtropicales en regiones frías no se puede producir. Sus frutos, igualmente, son muy sensibles a las bajas temperaturas, ya sea por transiciones de fase en las membranas celulares, alteraciones en el citoesqueleto, modificaciones conformacionales de proteínas o cambios en la cinética de reacciones enzimáticas clave.

Previamente al inicio de este trabajo, habíamos determinado en nuestro laboratorio que los frutos del chirimoyo son especialmente sensibles a las bajas temperaturas. Su maduración resulta sensiblemente afectada cuando los frutos son conservados por debajo de una temperatura crítica que oscila entre 10°C y 12°C, dependiendo de la época de recolección y zona de procedencia, entre otros factores (Lahoz y Vargas, resultados no publicados).

Cuando los frutos maduran en condiciones de temperatura, humedad y atmósfera adecuadas desarrollan unas características organolépticas (color, textura, sabor, acidez y aroma) que los hacen muy apreciados gastronómicamente.

La capacidad de los frutos para realizar una maduración normal, cuando son conservados a bajas temperaturas, depende también del estado de madurez. Cuando los frutos son conservados a 22°C durante tres o cuatro días, con lo que alcanzan un estado próximo al óptimo para su consumo, pueden ser conservados a temperaturas tan bajas como 1°C y son capaces de terminar la maduración. Sin embargo, cuando la conservación a bajas temperaturas se comienza con anterioridad, los frutos se ven imposibilitados para realizar la maduración, produciéndose en cambio una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos, cuyo resultado es final es la producción de alcoholes y aldehidos, lo que unido al no reblandecimiento de los frutos, hace de ellos un producto inaceptable (Lahoz y Vargas, resultados no publicados).

El momento en el que los frutos admiten una refrigeración más intensa, parece que viene determinado por la aparición del climaterio. Una vez que se ha producido el pico de etileno, aparentemente, todos los mecanismos bioquímicos necesarios para la normal maduración del fruto están puestos en juego, por lo que la refrigeración por debajo de la temperatura crítica no hace más que retrasar el proceso final permitiendo un cierto margen de conservación, que puede llegar a las dos semanas.

Cuando la conservación de los frutos a bajas temperaturas se produce desde el momento de su recogida, algunos procesos bioquímicos deben verse afectados, entre ellos la producción de etileno (Lahoz y Vargas, resultados no publicados), que serán responsables de la aparición de los daños por frío.

En el estado de madurez fisiológica de los frutos del chirimoyo, momento adecuado para su recogida, las células del mesocarpio presentan un alto contenido en almidón que será degradado hasta su casi total desaparición durante los cinco o seis días que dura la maduración normal. Este proceso se ve ampliamente retardado a medida que disminuye la temperatura de conservación, no obstante, cuando los frutos son conservados a 4°C o a 1°C, durante periodos variables de tiempo, y luego trasladados a 22°C son capaces de culminar la degradación.

Estos resultados indican claramente que durante la conservación no se producen alteraciones en los sistemas enzimáticos requeridos, sino únicamente un enlentecimiento en su acción.

El contenido en almidón de las chirimoyas, sin ser tan elevado como en otros frutos donde llega a constituir el 25% del peso de tejido húmedo, como en bananas (Hubbard *et al.*, 1990), oscila en torno al 10-12% del peso total del tejido verde.

La hidrólisis del almidón es responsable de la elevación en azúcares solubles durante la maduración como ocurre en otras plantas (Biale y Young, 1981; Rhodes, 1980; Palmer, 1971). Sin embargo todavía no está aclarada la ruta metabólica capaz de convertir el almidón en sacarosa, glucosa y fructosa.

Hay numerosas enzimas que pueden participar en la degradación de los gránulos de almidón (para una revisión ver Steup, 1988). En chirimoya no debe actuar en ningún momento la β -amilasa ya que no se

ha detectado la presencia de maltosa por métodos enzimáticos, ni tampoco tras la separación de azúcares por HPLC.

Nuestros resultados indican que los patrones de desaparición de almidón y aparición de sacarosa, glucosa y fructosa son semejantes en chirimoya y en banana, con la salvedad de que las concentraciones de los diferentes azúcares varían de una especie a otra (Beaudry et al., 1989).

Se cree que en bananas, el almidón es fundamentalmente degradado por una fosforilasa y convertido mayoritariamente en glucosa 6-fosfato, que puede derivar hasta triosas-fosfato, dentro de los amiloplastos (Hubbard et al., 1990), aunque esta ruta es también predominante en otras especies vegetales (Echeverría et al., 1988; McDonald y Rees, 1983).

Glucosa 6-fosfato y triosas-fosfato son transportadas a través de la membrana del amiloplasto, cuando esta está intacta, o difunden en el citosol. La conversión de estos intermediarios metabólicos en sacarosa debe tener lugar por un incremento considerable en la ruta gluconeogénica, con un consumo neto de ATP. En este sentido está bien documentado que la conversión de almidón en sacarosa no se produce en ausencia de un incremento paralelo en la respiración (Quazi y Freebairn, 1970; McGlasson et al., 1971; Kanellis et al., 1989), y esta ruta metabólica podría, en parte, ser responsable del incremento en la respiración durante el climaterio (Hubbard et al., 1990).

Está demostrado que en periodo de síntesis de sacarosa durante el climaterio hay un incremento en el flujo gluconeogénico por encima de 50 veces, mientras que el flujo glucolítico lo hace sólo dos o tres veces. Al final del climaterio se anula el flujo gluconeogénico, manteniéndose la elevación en el flujo glucolítico.

Aparentemente, el incremento en la gluconeogénesis es mantenido por el enzima pirofosfato:fructosa 6-fosfato fosfotransferasa (PPi-PFK). El incremento glucolítico sostenido, puede ser responsable del descenso en la concentración de glucosa que se observa cuando los frutos han completado la maduración, entrando en las etapas finales de la senescencia.

Los sistemas celulares de membrana se ven severamente alterados durante la maduración a cualquier temperatura. Los frutos lesionados

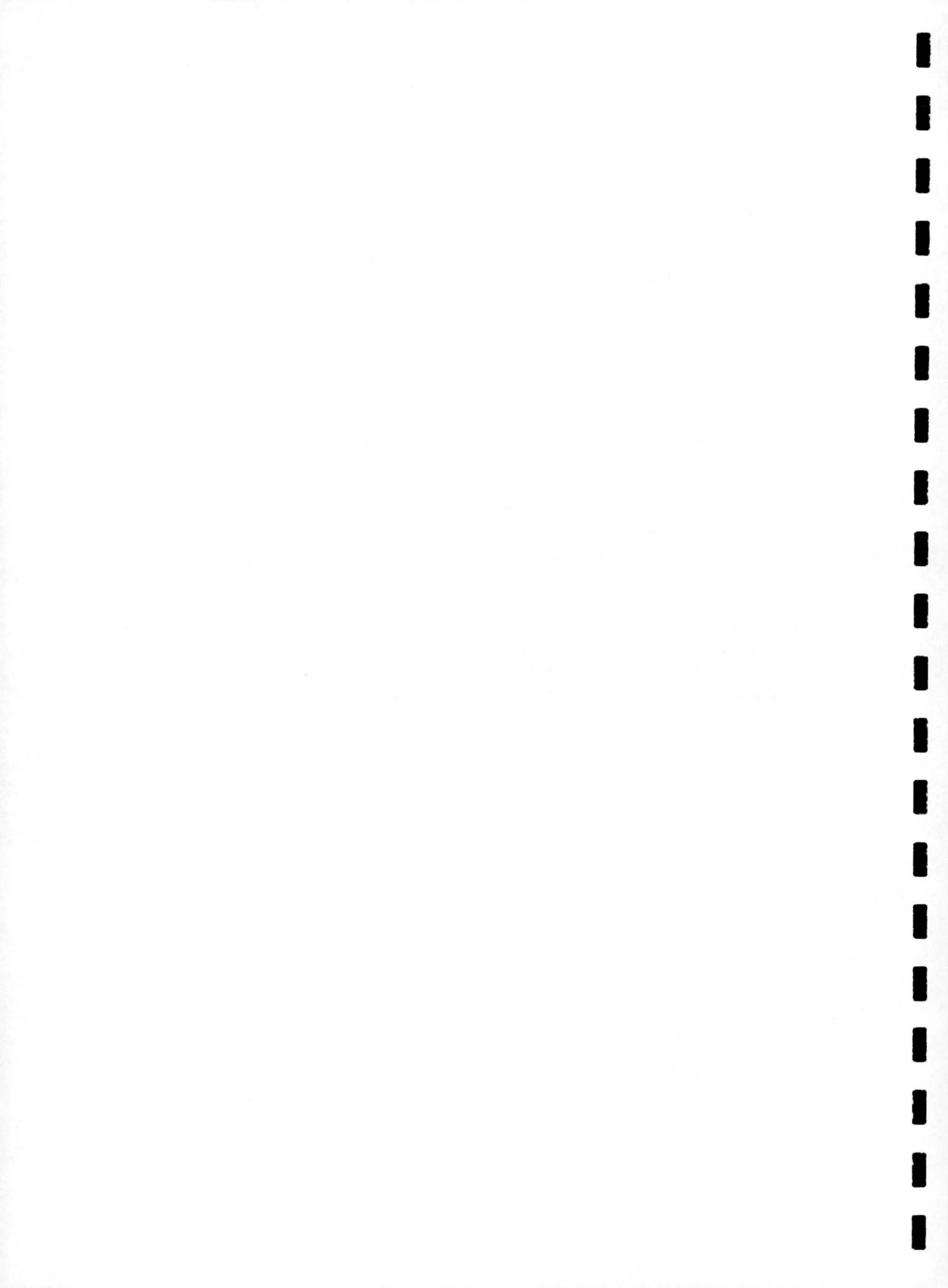
presentan las mayores alteraciones.

Del estudio sobre la composición de lípidos se puede deducir que los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono son componentes imprescindibles de las membranas celulares. Su contenido evoluciona a lo largo de la maduración en cualquier condición, en sentido contrario al que se observa para los ácidos grasos saturados, cuyo mayor representante es el ácido palmítico.

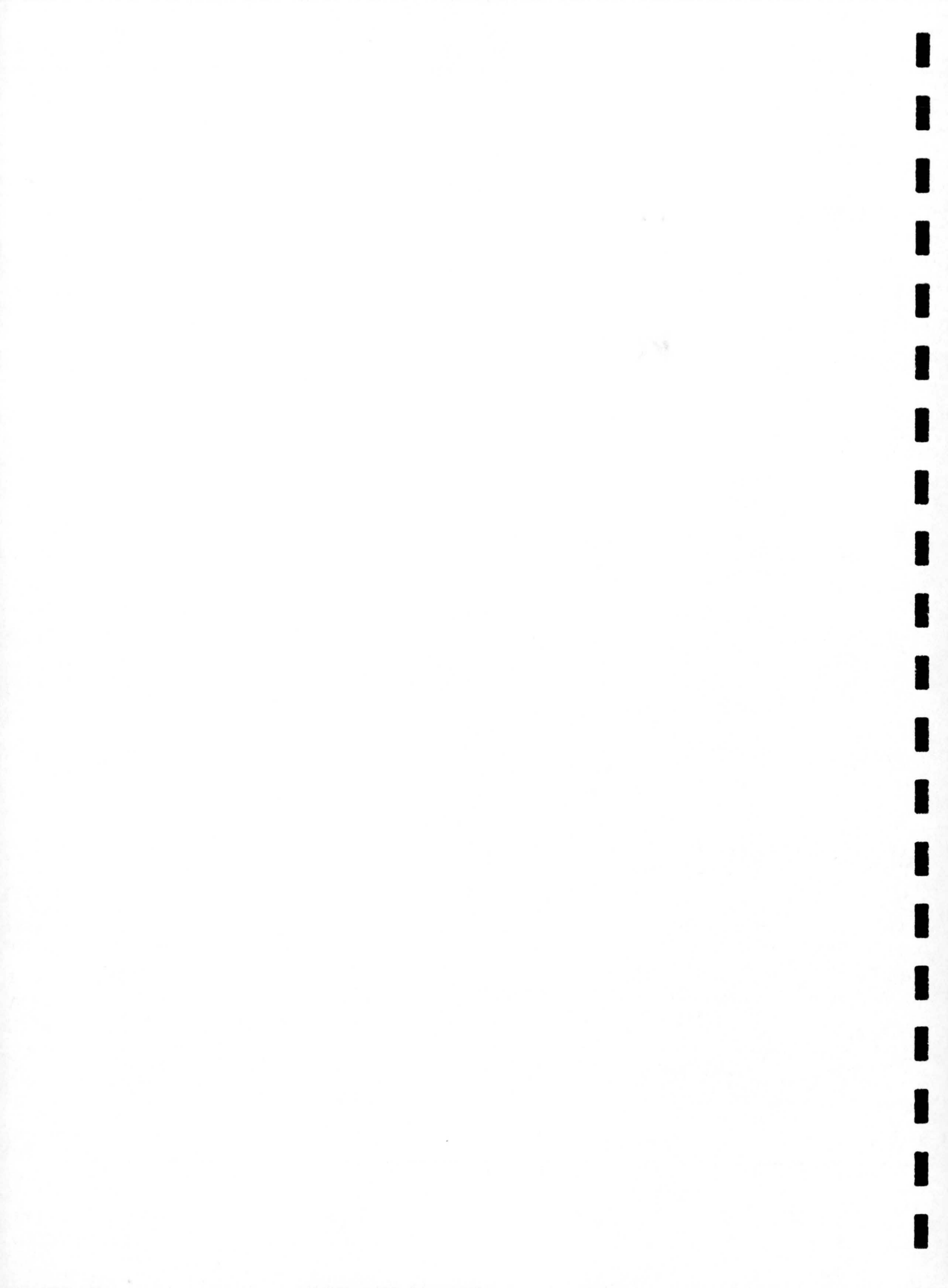
El estudio ultraestructural de los tejidos de frutos de chirimoyo sometidos a diferentes tratamientos para su conservación, confirma los resultados bioquímicos obtenidos. A bajas temperaturas no se produce la evolución normal en el contenido de azúcares solubles debido a que no se degrada el almidón, que puede observarse en muchos casos envuelto en sistemas de membrana.

Durante la maduración normal, ocurre simultáneamente la degradación de las paredes celulares, del almidón y la desorganización progresiva de los sistemas de membrana.

Aunque los dos primeros procesos se ven frenados durante la maduración a bajas temperaturas, no ocurre lo mismo con las modificaciones en los sistemas de membrana, que posiblemente se ve acelerada por las reacciones oxidativas, que se producen en respuesta a las condiciones experimentales de estrés térmico.



VI. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- 1.- Cuando los frutos del chirimoyo son almacenados a temperaturas inferiores a 12°C, se producen alteraciones graves en el patrón de maduración. Estos frutos son incapaces de madurar correctamente, por más que se prolongue el periodo de conservación a baja temperatura. Si, por el contrario, son transportados a ambientes con temperaturas de 20°C - 22 °C, los daños por frío se manifiestan a los dos o tres días, con la aparición de zonas lesionadas característicamente.
- 2.- Hemos determinado que durante la maduración a 22°C se produce una degradación masiva de almidón. Paralelamente se incrementan los niveles de azúcares solubles, fundamentalmente glucosa y fructosa. A medida que disminuye la temperatura de almacenamiento de los frutos, se produce un descenso en la velocidad de este proceso hasta detenerse por completo. Cuando los frutos dañados son calentados hasta 22°C, se degrada el almidón, aparentemente con normalidad, demostrando que los enzimas implicados no han sufrido alteraciones graves durante el almacenamiento en frío, salvo en zonas discretas del fruto que hemos denominado lesiones rosadas, de acuerdo con su coloración.
- 3.- Algunos enzimas del metabolismo oxidativo están implicados en la maduración normal de estos frutos. En este trabajo se ha determinado la actividad de la catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa. Mientras que el primero sufre una pérdida gradual de actividad durante la maduración, los otros dos parecen ser necesarios para que ésta se produzca. Se ha demostrado que incrementan su actividad en el transcurso de la maduración, posiblemente debido a su importancia en la biosíntesis de etileno y en la eliminación de radicales libres. Los frutos dañados por almacenamiento prolongado a bajas temperaturas pierden la capacidad de incrementar la actividad específica de estos enzimas, hecho que podría estar relacionado con la aparición de las lesiones.
- 4.- El metabolismo lipídico cumple un papel determinante durante la maduración. Se ha demostrado que cuando ésta se produce a 22°C, el día tercero tras la recogida marca la barrera entre dos comportamientos metabólicos diferentes. Hasta este momento los

ácidos grasos poliinsaturados de la fracción fosfolipídica incrementan su contenido porcentual, especialmente el ácido linoléico, aunque disminuye el contenido total en fósforo lipídico. Este comportamiento se invierte durante las etapas finales de la senescencia. Este día coincide con el inicio del pico climatérico, por lo que cabe suponer que ambos procesos estén relacionados. La disminución en la concentración de los ácidos linoléico y linolénico podría estar ligada con la actividad lipoxigenasa, la síntesis de etileno y la de octadecanoides, como el ácido jasmónico, equivalentes de los eicosanoides animales.

- 5.- Cuando los frutos maduran a 12°C, este comportamiento es semejante aunque retrasado en el tiempo. Sin embargo, a temperaturas inferiores los cambios en el contenido de ácidos grasos presentan patrones completamente diferentes.
- 6.- Se ha hecho un estudio del contenido y composición en ácidos grasos de los tejidos lesionados de frutos de chirimoyo, como consecuencia de su almacenamiento a bajas temperaturas, así como en frutos madurados en condiciones normales. En cada tipo de tejido se observan especies lipídicas características. En tejido maduros en condiciones normales y, más aún, en lesiones rosadas se produce un fuerte incremento porcentual de lípidos apolares, posiblemente esteroides esterificados, lo que se ve reflejado cuando se establecen índices entre éstos y el contenido total de fosfolípidos.
- 7.- Los cambios en composición en frutos maduros o lesionados, se manifiestan morfológicamente. El estudio ultraestructural de los frutos demuestra que los cambios más aparentes durante la maduración son la degradación de las paredes celulares, de los gránulos de almidón, así como, la degradación de los sistemas de membrana. Los tejidos lesionados modifican su el patrón de maduración normal. Aunque las paredes celulares no se degradan, lo que explicaría la mayor resitencia a la rotura, las membranas sufren graves alteraciones.

PARCHEMIN

GALGO



VII. BIBLIOGRAFIA

EXHIBIT 101

101-101

101-101



REFERENCIAS

- AWAD M. and YOUNG R.E. (1979) Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectin methyl esterase in avocado fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* 64:306-308.
- AZCON-BIETO J., LAMBERS H. and DAY D.A. (1983) Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration. *Plant Physiol.* 72: 598-603.
- AZCON-BIETO J. and OSMOND C.B. (1983) Relationship between photosynthesis and respiration. The effect of carbohydrate status on the rate of CO₂ production by respiration in darkened and illuminated wheat leaves. *Plant Physiol.* 71:574-581.
- BALDWIN E.A. and PRESSEY R. (1988) Tomato polygalacturonase elicits ethylene production in tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(1):92-95.
- BARBER R.F. and THOMPSON J.E. (1983) Neutral lipids rigidify unsaturated acyl chains in senescing membranes *J. Exp. Bot.* 34:268-276.
- BARTLEY I.M. (1984) Lipid metabolism in ripening apples. *Phytochemistry* 24:2857-2859.
- BARTLEY I.M. and KNEE M. (1982) The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.* 9:47-58.
- BATTEN D.J. (1990) Effect of temperature on ripening and postharvest life of fruit of atemoya (*Annona cherimolia* Mill. x *A. squamosa* L.) cv. 'African Pride'. *Sci. Hortic.* 45:129-136.
- BEN-AIRE R., KISLEV N. and FRENKEL C. (1979) Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiol.* 64:197-202.
- BENNETT A.B., SMITH G.M. and NICHOLS B.G. (1987) Regulation of climacteric respiration in ripening avocado fruit. *Plant*

Physiol. 83:973-76.

- BERGMEYER H.U., BERNT E., SCHMIDT F. and STARK H. (1974) Determination with Hexokinase and Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: **Methods of Enzymatic Analysis.**(Bergmeyer H.U. ed.) pp. 1197-1201. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.
- BERGMEYER H.U. and BERNT E. (1974a) Sucrose. In: **Methods of Enzymatic Analysis.** (Bergmeyer H.U. ed.) pp. 1176-1179. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.
- BERGMEYER H.U. and BERNT E. (1974b) Fructose. In: **Methods of Enzymatic Analysis.** (Bergmeyer H.U. ed.) pp. 1304-1307. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.
- BIALE J.B. (1941) Relation between ripening and respiration of the Fuerte avocado. **Proc. Am. Soc. Hort. Sci.** 39:137-142.
- BIALE J.B. (1950) Postharvest physiology and biochemistry of fruits. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 1:183-206.
- BIALE J.B. (1960) Postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. **Advan. Food Res.** 10:293-354.
- BIALE J.B. and YOUNG R.E. (1971) The avocado pear. In: **The Biochemistry of Fruit and their Products.** ed. A.C. Hulme. Vol 2, pp. 1-62. London. Academic Press.
- BIALE J.B., YOUNG R.E. and OLMSTEAD A.J. (1954) Fruit respiration and ethylene production. **Plant Physiol.** 29:168-74.
- BIRCHMEIER W. (1984) Cytoskeleton structure and function. **Trend Biochem. Sci.** 9:192-195.
- BLACKMAN F.F. and PARIJA P. (1928) Analytical studies in plant respiration. I. The respiration of a population of senescent ripening apples. **Proc. R. Soc. London Ser.** 103:412-45.
- BRADFORD M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254.

- BRADY C.J. (1987) Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38:155-178.
- BRADY C.J., MacALPINE G., McGLASSON W.B. and UEDA Y. (1982) Polygalacturonase in tomato fruits and the induction of ripening. *Aust. J. Plant Physiol.* 9:171-178.
- BRADY C.J., McGLASSON W.B., PEARSON J.A., MELDRUM S.K. and KOPELIOVITCH E. (1985) Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium and firmness in tomato fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 110:254-258.
- BRADY C.J., MELDRUM S.K., McGLASSON W.B. and ALI Z.M. (1983) Differential accumulation of the molecular forms of polygalacturonase in tomato mutants. *J. Food Biochem.* 7:7-14.
- BRADY C.J. and O'CONNELL P.B.H. (1976) On the significance of increased protein synthesis in ripening banana fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:301-310.
- BROUGHTON W.J. and TAN G. (1979) Storage conditions and ripening of the custard apple *Annona squamosa* L. *Scientia Hort.* 10:73-82.
- BROWN B.I. and SCOTT K.J. (1985) Cool storage conditions for custard apple fruit (*Annona atemoya* Hort.). *Singapore J. Primary Ind.* 13:23-31.
- BROWN B.I., WONG L.S., GEORGE A.P. and NISSEN R. (1988) Comparative studies on the postharvest physiology of fruit from different species of *Annona* (custard apple). *J.Hort.Sci.* 63:521-528.
- BUESCHER R. W. and HOBSON G. E. (1982) Role of calcium and chelating agents in regulating the degradation of tomato fruit tissue by polygalacturonase. *J. Food Biochem.* 6:147-60.
- BURG S.P. and BURG E.A. (1962) Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol.* 37:179-189.
- BURG S.P. and BURG E.A. (1967) Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* 42:144-152.
- BUTLER R.D. and SIMON E.W. (1971) Ultrastructural aspects of senescence in plants. *Adv. Gerontol. Res.* 3:73-129.

- CALDWELL and HAUG (1981) *Physiol. Plant.* 53:117-124.
- CASAS A. (1983) Alteraciones fisiológicas en la corteza de los frutos cítricos ocasionadas por el frío, en el transporte y almacenamiento refrigerados. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 23:321-36.
- CROOKES P.R. and GRIERSON D. (1983) Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.* 72:1088-1093.
- DAINES R.H., HAMMOND D.F., HAARD N.F. and M.J. CEPONIS (1976) Hardcore development in sweet potatoes. A response to chilling and its remission as influenced by cultivar, curing temperatures, and time and duration of chilling. *Phytopathology* 66:582-587.
- DAVIS P.L. and HOFMANN R.C. (1973) Reduction of chilling injury of citrus fruits in cold storage by intermittent warming. *J. Food Sci.* 38:871-873.
- DAWSON and LLOYD (1987)
- De JAEGHER G.N., BOYER M.C. and GASPAR T. (1987) Thigmomorphogenesis in *Brionia dioica*: Early events in ethylene biosynthesis pathway. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 182:49-56.
- De la PLAZA J.L. (1979) Controlled atmosphere storage of cherimoya. **XVth INTERNATIONAL CONGRESS OF REFRIGERATION (Venice 1979) Proceedings Vol.III.** pp. 701-712.
- DEKKER R.F.H. and RICHARDS G.N. (1971) Determination of starch in plant material. *J.Sci.Food Agric.* 22:441-444.
- DHINDSA R.J., DHINDSA P.P. and THORPE T.A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32:93-101.
- DIXON et al., (1979) *Enzymes* Longman. London
- EAKS I.L. (1956) Effect of modified atmospheres on cucumbers at chilling and nonchilling temperatures. *Proc. Am. Soc. Hort.*

- Sci. 67:473-478.
- EAKS I.L. (1985) Effect of calcium on ripening, respiratory rate, ethylene production and quality of avocado fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 110:145-148.
- ELKASHIF M.E. and HUBER D.J. (1988) Electrolyte leakage, firmness, and scanning electron microscopic studies of watermelon fruit treated with ethylene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(3):378-381.
- FERGUSON I.B. (1984) Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant Cell Environ.* 7:477-489.
- FOLCH J., LEES B. and SLOANE-STANLEY G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- FRENKEL C. and DYCK R. (1973) Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. *Plant Physiol.* 51:6-9.
- FRENKEL C. and ESKIN M. (1977) Ethylene evolution as related to changes in hydroperoxides in ripening tomato fruits. *HortScience* 12:552-553.
- FRENKEL C. and MUKAI M.K. (1984) Possible role of fruit cell wall oxidative activity in ethylene evolution. In **Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects.** pp. 303-316. The Hague: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk. 275 pp.
- FRIEND J. and RHODES M.J.C. (1981) **Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables.** 275 pp. London. Academic Press.
- FUSTER C. and PRESTAMO G. (1980) Variation of cherimoya (*Annona cherimola*) texture during storage, as determined with an Instron food testing instrument. *J. Food Sci.* 45:142,143,145.
- GANE R. (1934) Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature* (London) 134:1008.
- GASPAR T. (1986) Integrated relationship of biochemical and physiological peroxidase activities. In: **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases.** (ed. H. Greppin, C. Penel and T. Gaspar) pp. 455-468. Université de Genève.

Switzerland.

- GELLER B.L. and WINGE D.R. (1983) A method for distinguishing Cu, Zn and Mn-containing superoxide dismutases. *Anal. Biochem* 128: 86-92.
- GEORGE A.P. and NISSEN R.J. (1985) The custard apple. Part 1. Species, varieties and rootstock selection. *Aust. Hortic.* 83:100-107.
- GEORGE A.P. and NISSEN R.J. (1988) The effects of temperature, vapour pressure deficit and soil moisture stress on growth, flowering and fruit set custard apple (*Annona cherimolaxAnnona squamosa*) 'Africa Pride'. *Scientia Hortic.* 34:183-191.
- GEORGE A.P., NISSEN R.J., IRONSIDE D.A. and ANDERSON P. (1989) Effects of nitidulid beetles on pollination and fruit set of *Annona* spp. hybrids. *Scientia Hortic.* 39:289-299.
- GEORGE A.P., NISSEN R.J. and HOWITT C. (1990) Effects of environmental variables and cropping on leaf conductance of custard apple (*Annona cherimolaxAnnona squamosa*) 'African Pride'. *Scientia Hortic.* 45:137-147.
- GREUB L.J. and WEDIN W.F. (1969) Effects of fineness of grind and periodic agitation on total available carbohydrate values obtained by enzyme saccharification. *Crop Sci.* 9:691-692.
- GRIERSON D. and TUCKER G.A. (1983) Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta* 157:174.
- GRIERSON D., TUCKER G.A. and ROBERTSON N.G. (1981) The molecular biology of ripening. In: *Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables*. pp. 147-158. London. Academic Press.
- GUTFREUND (1972) *Enzymes: Physical principles* Wiley (Interscience). New York.
- GUTIERREZ M., LAHOZ J.M., PASCUAL L. and VARGAS A.M. (1991) Effect of storage on the content of ..
- HAISSIG B.E. and DICKSON R.E. (1979) Starch measurement in plant

- tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiol. Plant.* 47:151-157.
- HANSEN E. (1966) Postharvest physiology of fruits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17:459-480.
- HANSON J.B., RINCON M. and ROGERS S.A. (1986) In: *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in plant development* (ed. A.J. Trewavas) pp. 253-260. Plenum, New York.
- HARVEY T. and CHAN C. Jr. (1988) Alleviation of chilling injury in papayas. *Hortscience* 23(5):868-870.
- HOBSON G.E. (1979) What factors are involved in the onset of ripening in climateric fruit?. *Curr. Adv. Plant. Sci.* 37:1-11.
- HOBSON G.E. (1980) Effect of the introduction of non-ripening mutant genes on the composition and enzyme content of tomato fruit. *J. Sci. Food Agric.* 31:578-584.
- HOBSON G.E., RICHARDSON C. and GILLHAM D.J. (1983) Release of protein from normal and mutant tomato cell walls. *Plant Physiol.* 71:635-638.
- HOBSON G.E., NICHOLS R., DAVIES J.N. and ATKEY P.T. (1984) The inhibition of tomato fruit ripening by silver. *J. Plant. Physiol.* 116:21-29.
- HOCHACHKA P.W. and SOMERO G.N. (1984) *Biochemical adaptation*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.
- HOFFMAN N.E. and YANG S.F. (1980) Changes in l-amino-ciclopropane-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to the ethylene production rates. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 105:492-495.
- HUBER D.J. (1983) The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hortic. Rev.* 5:169-219.
- HUBER D.J. (1984) Strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit softening, the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *J. Food Sci.* 49:1310-1315.
- HULME A.C. (1970) *The biochemistry of fruits and their products*.

Vol.2, 788 pp. London. Academic Press.

- HULME A.C., SMITH W.H. and WOOLTORTON L.S.C. (1964) Biochemical changes associated with the development of low-temperature breakdown in apples. *J. Sci. Food Agr.* 15:303-307.
- INOUE and SATO (1967) *J. Gen. Physiol.* 50:259-292
- JEFFERY D.C., SMITH C., GOODENOUGH P., PROSSER I. and GRIERSON D. (1984) Ethylene-independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 74:32-38.
- JERIE P.H., HALL M.A. and ZERONI M. (1978) Aspects of the role of ethylene in fruit ripening. *Acta Hort.* 80:325-332.
- JUNIPER and LAWTON (1979) *Planta* 145:411-416
- KALRA S. K. and BROOKS J.L. (1973) Lipids of ripening tomato fruit and its mitochondrial fraction. *Phytochemistry* 12:487-492.
- KAMPS T.L., ISLEIB T.G., HERNER R.C. and SINK K.C. (1987) Evaluation of techniques to measure chilling injury in tomato. *HortScience* 22(6):1309-1312.
- KANG B.G., NEWCOMB W. and BURG S.P. (1971) Mechanisms of auxin-induced ethylene production. *Plant Physiol.* 47:504-509.
- KATO K., ABE K. and SATO R. (1977) The ripening in apple fruits. I. Changes in respiration, C_2H_4 evolution and internal C_2H_4 concentration during maturation and ripening. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 46(3):380-88.
- KENRICH J.R. and BISHOP D.G. (1986) *Plant. Physiol.* 81:946-949
- KHUDAIRI A.K. (1972) The ripening of tomatoes. *Am. Sci.* 60:696-707.
- KITAMURA T., ITAMURA H. and FUKUSHIMA T. (1983) Ripening changes in respiration, ethylene emanation and abscisic acid content of plum (*Prunus salicina*) fruit. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 52:325-331.
- KOKKINAKIS D.M. and BROOKS J.L. (1979) Hydrogen-peroxide mediated oxidation of indole-3-acetic acid by tomato peroxidase and

- molecular oxygen. *Plant Physiol.* 64:220-223.
- KUSHMAN L.J. and DEONIER M.T. (1959) Relation of internal gas content and respiration to keeping quality of Porto Rico sweet potatoes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 74:622-641.
- LAHOZ J., GUTIERREZ M., MARTINEZ-CAYUELA M., PASCUAL L. y VARGAS A.M. (1991) Efecto de la refrigeración sobre la maduración del fruto del chirimoyo. *Ars Pharmaceutica* En prensa
- LAURITZEN J.I. (1931) Some effects of chilling temperatures on sweet potatoes. *J. Agr. Res.* 42:617-627.
- LAW J.M. (1977) Factors affecting the purchase and use of sweet potatoes. *Louisiana State Univ. Agr. Expt. Sta. Bul.* 706.
- LESHAM Y.Y. (1984) Interaction of cytokinins with lipid-associated oxy free radicals during senescence: a prospective mode of cytokinin action. *Can. J. Bot.* 62:2943-2949.
- LEWIS D.A. (1956) Physiological studies of tomato fruits injured by holding at chilling temperatures. PhD thesis. Univ. California, Davis. 153 pp.
- LEWIS D.A. and MORRIS L.L. (1956) Effects of chilling storage on respiration and deterioration of several sweet potato varieties. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 68:421-428.
- LIEBERMAN M (1979) Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:533-91.
- LIEBERMAN M. and BIALE J.B. (1956) Effectiveness of ethylenediaminetetraacetic acid in the activation of oxidations mediated by mitochondria from broccoli buds. *Plant Physiol.* 31:420-424.
- LIEBERMAN M., CRAFT C.C. and WILCOX M.S. (1959) Effect of chilling on the chlorogenic acid and ascorbic acid content of Porto Rico sweet potatoes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 74:642-648.
- LIU Y., HOFFMAN N.E. and YANG S.F. (1985) Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimateric tomato and cantaloupe fruits.

- Plant Physiol. 77:407-411.
- LURIE S. and BEN-AIRE R. (1983) Microsomal membrane changes during the ripening of apple fruit. *Plant Physiol.* 73:636-638.
- LYONS J.M. (1973) Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol* 24:445-466.
- LYONS J.M., McGLASSON W.B. and PRATT H.K. (1962) Ethylene production, respiration, & internal gas concentrations in cantaloupe fruits at various stages of maturity. *Plant Physiol.* 37:31-36.
- LYONS J.M. and RAISON J.K. (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45:386-389.
- LYONS J.M., RAISON J.K. and STEPONKUS P.L. (1979) The plant membrane in response to low temperature: An overview. In: *Low Temperature Stress in Crop Plants* pp. 1-24. J.M. Lyons, D. Graham and J.K. Raison (eds.). Academic, New York.
- LIPTON W.J. and WANG C.Y. (1987) Chilling exposures and ethylene treatment change the level of ACC in 'Honey Dew' melons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112(1):109-112.
- MAJMUDAR G., MODI V.V. and PALEJWALA V.A. (1981) Effect of plant growth regulators on mango ripening. *Ind. J. Exp. Biol.* 19:885-886.
- MARANGONI A.G., SMITH A.K., YADA R.Y. and STANLEY D.W. (1989) Ultrastructural changes associated with chilling injury in mature-green tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(6):958-962.
- MAREI N. and CRANE J. C. (1971) Growth and respiratory response of fig (*Ficus carica* L. cv. Misson) fruits to ethylene. *Plant Physiol.* 48:249-54.
- MARRIOT J. (1980) Bananas. Physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13:41-48.
- MARTINEZ-CAYUELA M., FAUS M.J. and GIL A. (1988) Effects of some

- reductants on the activity of cherimoya polyphenoloxidase. *Phytochemistry* 27:1589-1592.
- MARTINEZ-CAYUELA M., PLATA M.C., FAUS M.J. and GIL A. (1988) Effect of some phenolic carboxylic acids on cherimoya (Annona cherimola) polyphenoloxidase activity. *J. Sci. Food Agric.* 45:215-222.
- MARTINEZ-CAYUELA M., PLATA M.C., SANCHEZ de MEDINA L., GIL A. and FAUS M.J. (1986) Evolucion de diversas actividades enzimáticas durante la maduración del chirimoyo en atmósfera controlada. *Ars. Pharm.* Tomo XXVII:371-380
- MARTINEZ-CAYUELA M., RODRIGUEZ-VICO F., FAUS M.J. and GIL A. (1989) Partial purification and intracellular localization of cherimoya (Annona cherimola Mill.) polyphenoloxidase. *J. Plant Physiol.* 133:660-663.
- MARTINEZ-CAYUELA M., SANCHEZ de MEDINA L., FAUS M.J. and GIL A. (1988) Cherimoya (Annona cherimola Mill.) polyphenoloxidase: monophenolase and dihydroxyphenolase activities. *J. Food. Sci.* 53:1191-1194.
- MATILE P. (1980) Catabolism of chlorophyll: involvement of peroxidase? *Z. Pflanzenphysiol.* 99-475-478.
- MATTOO A.K., MURATA T., PANTASTICO E.B., CHACHIN K., OGATA K. and PHAN C.T. (1975) Chemical changes during ripening and senescence. In: *Postharvest Physiology: Handling and Utilization of Tropical and Subtropical Fruits and Vegetables* (E.B. Pantastico ed.) pp. 103-127. AVI. Westport. Connecticut.
- McCORD J.M. and FRIDOVICH I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 243:5753-5760
- McMURCHIE E.J., McGLASSON W.B. and EAKS I.L. (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237:235-236.
- MIGH D.F. (1971) Production of farnesene and incidence of scald in stored apples. In: *The Biochemistry of Fruits and Their Products.* (ed. A.C. Hulme) 1:555-569. New York: Academic. 788 pp.

REFERENCIAS

- MILLER E.V. (1946) Physiology of citrus fruits in storage. *Bot. Rev.* 12:393-423.
- MILLERD A., BONNER J. and BIALE J. B. (1953) The climacteric rise in fruit respiration as controlled by phosphorylative coupling. *Plant Physiol.* 28:521-31.
- MILLERD A., GOODCHILD D.J. and SPENCER D. (1969) Maize mutant sensitive to low temperature. II. Chloroplast structure, development and physiology. *Plant Physiol.* 44:567-583.
- MINORSKY (1985) *Plant. Cell Environ.* 8:75-94
- MIZRAHI Y., DOSTAL H. and CHERRY J. (1975) Ethylene-induced ripening in attached 'rin' fruits, a non-ripening mutant of tomato. *HortScience* 10:414-415.
- MIZRAHI Y., DOSTAL H.C., McGLASSON W.B. and CHERRY J.H. (1975) Effects of abscisic acid and benzyladenine on fruits of normal and rin mutant tomatoes. *Plant Physiol.* 56:544-546.
- MOLINE H.E.(1976) Ultrastructural changes associated with chilling of tomato fruit. *Cytology and Histology Phytopathology* 66: 617-624
- MOREJOHN and FOSKET (1982) *Nature* 297:426-428
- MORRIS L.L. (1982) Chilling injury of horticultural crops: an overview. *HortScience* 17:161-162.
- MORRISON W. and SMITH L. (1964) Preparation of fatty methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron trifluoride methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
- MOWLAH G. and ITOO S. (1983) Changes in pectic components, ascorbic acid, pectic enzymes and cellulase activity in ripening and stored guava. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 30:454-461.
- MURATA T. (1969) Physiological and biochemical studies of chilling injury in bananas. *Physiol. Plant.* 22:401-411.
- MURATA N. (1984) *Adv. Agric. Biotechnol.* 3:131-138.

- MURATA N. and YAMAYA J. (1984) *Plant Physiol.* 74:1016-1024
- ONO T., MURATA N. and FUJITA T. (1983) *Plant Cell Physiol.* 24:635-639.
- PALIYATH G. and POOVAIAH B.W. (1985) Calcium- and calmodulin-promoted phosphorylation of membrane protein during senescence in apples. *Plant Cell Physiol.* 26:977-986.
- PALIYATH G., POOVAIAH B.W., MUNSKE G.R. and MAGNUSON J.A. (1984) Membrane fluidity in senescing apples: effects of temperature and calcium. *Plant Cell Physiol.* 25:1083-1087.
- PANTASTICO E.B. (1968) Postharvest physiology of fruits. I. Chilling injury. *Phillipine Agr.* 51:697-730.
- PANTASTICO E.B., SOULE J. and GRIERSON W. (1968) Chilling injury in tropical and subtropical fruits. II. Limes and grapefruit. *Proc. Trop. Reg. Am. Soc. Hort. Sci.* 12:171-183.
- PANTASTICO E.B., MATOO A.K., MURATA T. and OGATA K. (1979)
- PATTERSON B.D., PAULL R. and GRAHAM D. (1979) In: *Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane* (ed. J.M. Lyons, D. Graham and J.K. Raison) pp. 25-35. Academic Press. New York.
- PAULL R.E. and CHEN N.J. (1983) Postharvest variation in cell wall degrading enzymes of papaya during fruit ripening. *Plant Physiol.* 72:382-385.
- PAULL R.E., DEPUTY J. and CHEN N.J. (1983) Changes in organic acids, sugars and head space volatiles during fruit ripening of soursop. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108:931-934.
- PICHA D.H. (1986) Sugar content of baked sweet potatoes from different cultivars and lengths of storage. *J. Food Sci.* 51:845-846.
- PICHA D.H. (1987) Chilling injury, respiration and sugar changes in sweet potatoes stored at low temperature. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112(3):497-503.

- PLATA M.C., SANCHEZ de MEDINA L., MARTINEZ-CAYUELA M., FAUS M.J. y GIL A. (1987) Modificaciones en la textura, el contenido proteico y las actividades polifenoloxidasas y peroxidasa de chirimoyo, inducidas por el almacenamiento en atmósfera hipobárica o en presencia de sulfito. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 27:215-224
- PLATT-ALOIA K.A., THOMSON W.W. and YOUNG R.E. (1980) Ultrastructural changes in the walls of ripening avocados: transmission, scanning and freeze fracture microscopy. *Bot. Gaz.* 141:366-373.
- PLATT-ALOIA K. A. y THOMSON W. W. (1981) Ultrastructure of the mesocarp of mature avocado fruit and changes associated with ripening. *Ann. Bot.* 48:451-65.
- POOVIAH B.W. and WUKSYZ A. (1979) Polygalacturonase and cellulase enzymes in the normal Rutgers mutant 'rin' tomato fruits and their relationship to the respiratory climateric. *Plant Physiol.* 64:534-537.
- PORTER W.C., PHARR D.M., KUSHMAN L.J. and POPE D.T. (1976) Discoloration of chilled sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) roots: Factors related to cultivar differences. *J. Food Sci.* 41:938-941.
- PRATT H.K. and BIALE J.B. (1944) Relation of the production of an active emanation to respiration in the avocado fruit. *Plant Physiol.* 19:519-528.
- PRATT H. K. and ESCHL J. D. (1969) Physiological roles of ethylene in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:541-84.
- PRATELLA G.C., TONINI G. and CESSARI A. (1969) Postharvest disease problems of Italian citrus fruit. *Proc. First Int. Citrus Symp.* 3:1371-1323.
- PRESSEY R. and AVANTS J.K. (1973) Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochim. Biophys. Acta* 309:363-369.
- PURVIS A.C., KAWADA K. and GRIERSON W. (1979) Relationship between midseason resistance to chilling injury and reducing sugar level in grapefruit. *Hortscience* 16:160-161.

- PURVIS A.C. (1980) Influence of canopy depth on susceptibility of Marsh grapefruit to chilling injury. *Hortscience* 15:731-733.
- PURVIS A.C. (1981) Free proline in peel of grapefruit and resistance to chilling injury during cold storage. *Hortscience* 16(2):160-161.
- PURVIS A.C. (1984) Importance of water loss in the chilling injury of grapefruit stored at low temperature. *Scientia Hort.* 23:261-267.
- PURVIS A.C. and GRIERSON W. (1982) Accumulation of reducing sugar and resistance of grapefruit peel to chilling injury as related to winter temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107(1):139-142.
- PURVIS A.C., KAWADA K. and GRIERSON W. (1979) Relationship between midseason resistance to chilling injury and reducing sugar level in grapefruit peel. *HortScience* 14(3)227-229.
- PURVIS A.C. and RICE J. D. (1983) Low temperature induction of invertase activity in grapefruit flavedo tissue. *Phytochemistry* 22(4):831-834.
- PÜTTER J. (1974) Peroxidases. **En: Methods of Enzymatic Analysis.** (Bergmeyer H.U. ed.) pp. 684-690. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.
- QUINN P.J. and WILLIAMS W.P. (1978) Plant lipids and their role in membrane function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 34:109-173.
- RHODES M.J.C. (1980) Respiration and senescence of plant organs. In: **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise.** ed. P.K. Stumpf and E.E. Conn. 2:419-462. London. Academic Press.
- RICHARDSON D. G. and AL-ANI A. M. (1982) Calcium and nitrogen effects on d'Anjou pear fruit respiration and ethylene evolution. *Acta Hort.* 124:195-201.
- RICHMOND A. and BIALE J. B. (1966) Protein and nucleic acid metabolism in fruits. I. Studies of amino acid incorporation during the climacteric rise of avocado. *Plant Physiol.* 41:1247-

53.

- RISSE L.A., BRECHT J.K., SARGENT S.A., LOCASCIO S.J., CRALL J.M., ELMSTROM G.W. and MAYNARD D.N. (1990) Storage characteristics of small watermelon cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(3):440-443.
- ROE B. and BRUEMMER J.H. (1981) Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of 'Keitt' mangoes. *J. Food Sci.* 46:186-189.
- ROTHAN C. and NICOLAS J. (1989) Changes in acidic and basic peroxidase activities during tomato fruit ripening. *Hortsci.* 24:340-342.
- SACHER J.A. (1973) Senescence and postharvest physiology. *Ann. Rev. Plant. Physiol* 24:197-224.
- SAGLIO P.H. and PRADET A. (1980) Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiol.* 66:516-519.
- SALTVEIT M.E., BRADFORD K.J. and DILLEY D.R. (1978) Silver ion inhibits ethylene synthesis and action in ripening fruits. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 103:472-75.
- SALTVEIT M.E. Jr. and CABRERA R.M. (1987) Tomato fruit temperature before chilling influences ripening after chilling. *HortScience* 22(3):452-454
- SANCHEZ de MEDINA L., PLATA M.C., MARTINEZ-CAYUELA M., FAUS M.J. y GIL A. (1986) Cambios en la actividad polifenoloxidasas, peroxidasa, catalasa y fosfatasa ácida de chirimoyo durante la maduración a temperatura y humedad controladas. *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 26:529-538
- SCHROEDER C.A. (1943) Hand pollination studies on the cherimoyer. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 43:39-41.
- SEIBLE D. (1939) The questions of the harming of plants by cold at temperatures above the freezing point. *Beitr. Biol. Pflanz.* 26:289-330.

- SIEGEL B.Z. and GALSTON A.W. (1967) *Science* 157:1557-1559.
- SINENSKY M. (1974) Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:522-525.
- SINGER S.J. and NICOLSON G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- SKIPSKI V.P. and BARCLAY M. (1969) Thin layer chromatography of lipids. In: *Methods in Enzymology*. J.M. Lowenstein, editor. Academic Press, New York. 14:548-550
- SOLOMOS T. and LATIES G.G. (1973) Cellular organization and fruit ripening. *Nature* 245:390-392.
- SOLOMOS T. (1983) Respiration and energy metabolism in senescing plant tissues. In: *Post-harvest physiology and crop improvement*. ed. M. Lieberman. pp. 61-98. New York. Plenum.
- SPEIRS J., BRADY C.J., GRIERSON D. and LEE E. (1984) Changes in ribosome organization and messenger RNA abundance in ripening tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 11:225-34.
- STOLL K. (1983) Tecniques recents de la conservació de les Fruites i les verdures en Atmosfera Controlada. *Jornades Obertes sobre Frigoconservació de la Fruita*. Barcelona (1982) pp.65-69.
- THEMMER A.P.N., TUCKER G.A. and GRIERSON D. (1982) the degradation of isolated tomato walls by purified polygalacturonase in vitro. *Plant Physiol.* 60:122-24.
- TIGCHELAAR E.C., McGLASSON W.B. and BUESCHER R.W. (1978) Genetic regulation of tomato fruit ripening. *HortScience* 13:508-513.
- TIGCHELAAR E.C., McGLASSON W.B. and FRANKLIN M.J. (1978) Natural and ethephon-stimulated ripening of F₁ hybrids of the ripening inhibitor (rin) and non-ripening inhibitor (nor) mutants of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) *Austral. J. Plant Physiol.* 5:449-456.
- TSAY L.M., MIZUNO S. and KOZUKUE N. (1984) Changes in respiration, ethylene evolution and abscisic acid content during ripening

REFERENCIAS

- and senescence of fruits picked at young and mature stage. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 52:458-463.
- TUCKER M.L. and LATIES G.G. (1984) Interrelationship of gene expression, polysome prevalence, and respiration during ripening of ethylene and/or cyanide-treated avocado fruit. *Plant Physiol.* 74:307-15.
- ULRICH R. (1958) Postharvest physiology of fruits. *Ann. Rev. plant Physiol.* 9:385-416.
- URITANI I., HYODO H. and KUWANO M. (1971) Phytopathological chemistry of sweet potato with black rot and injury. 88. Mechanism of cold injury in sweet potatoes. IV. Biochemical mechanism of cold injury with special reference to mitochondrial activities. *Agr. Biol. Chem.* 1248-1253.
- VEEN H. (1983) Silver thiosulphate: an experimental tool in plant science. *Sci. Hortic.* 20:211-24.
- VEEN H. (1985) Antagonistic effect of silver thiosulphate or 2,5-norbornadiene on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid stimulated growth of pistils in carnation buds. *Physiol. Plant.* 65:2-8.
- VENDRELL M. (1969) Reversion of senescence: effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and indole acetic acid on respiration, ethylene production and ripening in banana fruit slices. *Aust. J. Biol. Sci.* 22:601-10.
- VENDRELL M. (1985a) Effect of abscisic acid and etephon on several parameters of ripening in banana fruit tissue. *Plant Sci.* 40:19-24.
- VENDRELL M. (1985b) Dual effect of 2,4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. *Physiol. Plant.* 64:559-63.
- VITELLO F. and ZANETTA J.P. (1978) Thin layer chromatography of phospholipids. *J. Chromatogr.* 166:637-640.
- WADE N.L. and BISHOP D.G. (1978) Changes in the lipid composition of ripening banana fruits and evidence for an associated increase in cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 529:454-464.

- WANG C.Y. and ANDERSON R.E. (1982) Progress on controlled atmosphere storage and intermittent warming of peaches and nectarines. pp. 221-228. In: *Proc. 34rd Natl. Calif. Res. Conf. Oregon State Univ. Timber Press, Beaverton, Ore.*
- WANG C.Y. and BAKER J.E. (1979) Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. *Plant Cell Physiol.* 20:243-251.
- WARD P.A., TILL G.O., HATHERILL J.R. ANNESLEY T.M. and KUNKEL R.G. (1985) Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation *J. Clin. Invest.* 76:517-527.
- WILLIAMS R.C., CORREIA J.J. and DeVRIES A.L. (1985) *Biochemistry* 24:2790-2798.
- WILLS R.B.H., POI A., GREENFIELD H. and RIGNEY C.J. (1984) Postharvest changes in fruit composition of *Annona atemoya* during ripening and effects of storage temperature on ripening. *HortScience* 19:96-97.
- WILLS R.B.H. and SCOTT K.J. (1971) Chemical induction of low-temperature breakdown in apples. *Phytochemistry* 10:1783-1785.
- WHITEMAN T.M. and WRIGHT R.C. (1946) The effects of temperature on losses in sweet potatoes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 48:437-442.
- WOODS *et al.*, (1984a) *Protoplasma* 121:8-16
- WOODS *et al.*, (1984b) *Protoplasma* 121:17-24
- WRIGHT S.T.C. and HIRON R.W. (1970) The acumulation of abscisic acid in plants during wilting and under other stress conditions. In *Plant Growth Substances*. Ed. D. Carr. pp. 291-298. Springer Verlag. Berlin.
- YAMAKI S. and URITANI I. (1972) Mechanism of chilling injury in sweet potato. VI. Changes of lipid components in the mitochondrial membrane during chilling storage. *Plant Cell Physiol.* 13:67-79.

YANG S.F. and HOFFMAN N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35:155-189.

ZHANG W. and LU Z.S. (1983) Relationship between abscisic acid and apricot (*Prunus armeniaca*) fruit ripening. *Acta Bot. Sin.* 25:537-543.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de la fecha, constituido por:

- D. M^o Dolores Suárez Ortega
- D. Victoriano Valpuesta Fernández
- D. Jose M^o Farré Masip
- D. M^o Isabel Rodríguez García
- D. Manuel Martínez Cayuela

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Doña MARGARITA GUTIERREZ GARCIA

se acordó por unanimidad otorgar la calificación de Apto "cum laude" y para que conste, se extiende firmada por los componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 2 de Julio de 1994.

El Secretario,

Manuel Martínez Cayuela

El Presidente,

M^o Dolores Suárez Ortega
M^o SUAREZ

El Vocal,

Jose M^o Farré Masip

El Vocal,

M^o Isabel Rodríguez García
Isabel Rodríguez García

El Vocal,

Victoriano Valpuesta Fernández
VICTORIANO VALPUESTA
FDEZ.