

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

**Desarrollo del daño por frío en
berenjenas (*Solanum melongena*) y
aplicación de atmósferas
modificadas pasivas**

Ana Gabriela Qüesta
Tesis Doctoral
2006

El presente trabajo de Tesis para optar por el título de *Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata*, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata) y en los Institutos de Ciencias Químicas y de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Facultad de Agronomía y Agroindustrias - Universidad Nacional de Santiago del Estero) bajo la dirección de la Dra. Alicia Raquel Chaves y la codirección del Dr. Horacio Tacashi Mishima.

A mi esposo Carlos, a mis hijos Ramiro, Diego, Carlos, Andrés y a mis padres que me acompañaron en este camino.

Agradecimientos

A la Dra. Alicia R. Chaves por su apoyo, confianza, aliento y comprensión durante estos años.

Al Dr. Horacio T. Mishima por su brindarme su apoyo y abrirme las puertas del Instituto de Ciencias Químicas.

A la Dra. Beatriz López de Mishima por su confianza y apoyo.

Al CIDCA por brindarme la oportunidad para realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional de Santiago del Estero que fortaleció mi constancia y agudizó mi ingenio para superar las innumerables dificultades.

A la Facultad de Agronomía y Agroindustrias por respaldarme y apoyarme para poder concurrir al CIDCA.

A mis compañeros del Instituto de Ciencias Química que me enseñaron y acompañaron durante los largos días de trabajo.

A mis compañeros del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y de la Planta Piloto por su compañerismo especialmente a Silvia y Nori que siempre estuvieron presentes y por su amistad.

A mis hermanos por su aliento y ayudarme en todo lo que pudieron.

A mi madre que me acompañó y rezó por mí.

A mi padre que, desde el cielo, me dio fuerzas a lo largo de todo el camino.

A mi esposo que supo comprenderme en los momentos difíciles y siempre me brindó su amor.

A mis hijos por las largas ausencias y las vacaciones frustradas.

Muchas gracias.

RESUMEN

En este trabajo de Tesis Doctoral se abordó el estudio, a través de distintos aspectos fisiológicos, del efecto de la baja temperatura sobre el desarrollo del daño por frío en berenjenas Black nite y la influencia de su almacenamiento en atmósferas modificadas pasivas como tratamiento para retardar su manifestación.

Los frutos se almacenaron a 3°C en bolsas perforadas de polietileno de baja densidad durante 12 días usándose frutos almacenados a 20°C como testigo. El almacenamiento en atmósfera modificada pasiva (AMP) se realizó en bolsas sin perforar. Se extrajeron muestras a los 0,5, 1, 2 y 3 días y, posteriormente, cada 3 días realizándose, además, la transferencia a 20°C por 48 horas para tiempos de almacenamiento iguales y superiores a los 3 días.

A partir del 3° día de refrigeración se observaron los primeros síntomas de daño que se acentuaron con el pasaje a 20°C. La pérdida de electrolitos fue significativa cuando los frutos alcanzaron un nivel de daño severo o muy severo y tanto el almacenamiento a 20°C como la transferencia evidenciaron valores mayores. Durante los 3 primeros días de conservación refrigerada se registró un incremento en la concentración de fenoles totales y flavonoides debiéndose, principalmente, la capacidad antiradical a éstos ya que no se detectó presencia de ácido ascórbico. Los principales ácidos grasos fueron palmítico, oleico, linoleico y linolénico y su perfil se vio influenciado por la temperatura de crecimiento de los frutos siendo mayor la concentración de ácidos saturados y monoinsaturados y menor la de poliinsaturados de los frutos desarrollados a mayor temperatura. Se registró un incremento de la actividad específica de lipoxigenasa durante las primeras horas que se reflejó en una disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos, observándose un marcado incremento de los primeros luego de 3 días de refrigeración. El grado de peroxidación aumentó antes de manifestarse signos visibles de daño.

El almacenamiento en AMP retardó la aparición del daño siendo menos marcadas las variaciones de fenoles totales y flavonoides. La capacidad antioxidante fue menor a la de los frutos almacenados a 3°C para tiempos de almacenamiento iguales y superiores a los 3 días. Los frutos sometidos al tratamiento no evidenciaron el aumento inicial en la actividad de lipoxigenasa ni la disminución inicial en los ácidos grasos poliinsaturados y se observó un adelanto en el incremento de los niveles de fosfolípidos que alcanzaron niveles menores al final de la conservación.

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Aspectos generales de la berenjena	1
1.1. Variedades	2
1.2. Recolección e índices de cosecha	3
1.3. Fisiología y bioquímica de crecimiento	4
1.4. Condiciones recomendadas de conservación	7
1.4.1. Temperatura y humedad relativa	7
1.4.2. Sensibilidad al etileno	7
1.4.3. Atmósferas controladas o modificadas	8
1.5. Desórdenes y enfermedades postcosecha	8
1.5.1. Desórdenes	8
1.5.1.1. Daño por frío	8
1.5.1.2. Daño por congelación	9
1.5.1.3. Daños físicos	9
1.5.2. Enfermedades	10
2. Daño por frío en productos vegetales	11
2.1. Síntomas del daño por frío	11
2.2. Mecanismos del daño por frío	12
2.2.1. Teoría de las proteínas	13
2.2.2. Teoría de la transición de fase	15
2.2.3. Teoría del estrés oxidativo	17

OBJETIVOS

1. Objetivo general	19
2. Objetivos específicos	19

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DEL DAÑO POR FRÍO EN BERENJENAS

I.1. Introducción	20
I.1.1. Daño por frío	20
I.1.2. Pérdida de electrolitos	21
I.1.3. Color	22
I.2. Objetivos	24
I.2.1. Objetivo general	24
I.2.2. Objetivos específicos	24
I.3. Materiales y métodos	25

I.3.1. Material vegetal	25
I.3.2. Almacenamiento	25
I.3.3. Determinaciones	25
I.3.3.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño	25
I.3.3.2. Pérdida de electrolitos	27
I.3.3.3. Pardeamiento de la pulpa	27
I.3.3.4. Potencial de oxidación	27
I.3.3.5. Color de la piel	28
I.3.3.6. Análisis estadístico	28
I.4. Resultados y discusión	29
I.4.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño	29
I.4.2. Pérdida de electrolitos	33
I.4.3. Pardeamiento de la pulpa	36
I.4.4. Potencial de oxidación	37
I.4.5. Color de la piel	38
I.5. Conclusiones	43
 CAPÍTULO II: VARIACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y DE LA ACTIVIDAD ANTIRADICAL	
II.1. Introducción	44
II.1.1. Compuestos fenólicos	44
II.1.2. Flavonoides	45
II.1.3. Actividad antiradical	47
II.2. Objetivos	50
II.2.1. Objetivo general	50
II.2.2. Objetivos específicos	50
II.3. Materiales y métodos	51
II.3.1. Material vegetal	51
II.3.2. Almacenamiento	51
II.3.3. Determinaciones	51
II.3.3.1. Fenoles	51
II.3.3.2. Flavonoides	53
II.3.3.3. Ácido ascórbico	54
II.3.3.4. Actividad antirradical	55
II.3.3.5. Análisis estadístico	57
II.4. Resultados y discusión	58
II.4.1. Fenoles	58
II.4.2. Flavonoides	60

II.4.3. Ácido ascórbico	62
II.4.4. Actividad antirradical	63
II.4.4.1. Cinética de disminución del DPPH*	63
II.4.4.2. Evolución de la actividad antirradical durante el almacenamiento	64
II.5. Conclusiones	66
 CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA	
III.1. Introducción	67
III.1.1. Tipos de lipoxigenasas	68
III.1.2. Rol fisiológico	69
III.2. Objetivos	72
III.2.1. Objetivo general	72
III.2.2. Objetivos específicos	72
III.3. Materiales y métodos	73
III.3.1. Material vegetal	73
III.3.2. Almacenamiento	73
III.3.3. Determinaciones	73
III.3.3.1. Medición de la actividad enzimática	73
III.3.3.2. Caracterización de la enzima	75
III.3.3.3. Contenido de proteínas	76
III.3.3.4. Análisis estadístico	77
III.4. Resultados y discusión	78
III.4.1. Caracterización de la enzima	78
III.4.1.1. Actividad enzimática	78
III.4.1.2. Efecto de la concentración de sustrato	78
III.4.1.3. Efecto de la concentración de enzima	80
III.4.1.4. Efecto del pH	80
III.4.1.5. Efecto de la temperatura	82
III.4.1.6. Estabilidad térmica de la enzima	83
III.4.2. Modificaciones de la actividad de LOX durante el almacenamiento	84
III.5. Conclusiones	86
 CAPÍTULO IV: EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS	
IV.1. Introducción	87

IV.1.1. Membranas biológicas	87
IV.1.2. Estructura de la membrana	88
IV.1.3. Lípidos de membrana	89
IV.1.4. Mecanismos de deterioro de la membrana	90
IV.2. Objetivos	92
IV.2.1. Objetivo general	92
IV.2.2. Objetivos específicos	92
IV.3. Materiales y métodos	93
IV.3.1. Material vegetal	93
IV.3.2. Almacenamiento	93
IV.3.3. Determinaciones	93
IV.3.3.1. Lípidos totales	93
IV.3.3.2. Ácidos grasos	95
IV.3.3.3. Fosfolípidos	96
IV.3.3.4. Peroxidación de lípidos	97
IV.3.3.5. Análisis estadístico	98
IV.4. Resultados y discusión	100
IV.4.1. Ácidos grasos	100
IV.4.2. Fosfolípidos	107
IV.4.3. Peroxidación	109
IV.5. Conclusiones	112
 CAPÍTULO V: APLICACIÓN DE ATMÓSFERA MODIFICADA PARA REDUCIR LA INCIDENCIA DEL DAÑO POR FRÍO	
V.1. Introducción	114
V.1.1. Tratamientos postcosecha para reducir la incidencia del daño por frío	114
V.1.2. Atmosferas modificadas	120
V.1.3. Beneficios y riesgos potenciales de las atmosferas modificadas	121
V.1.4. Tipos de atmosferas modificadas	123
V.1.5. Películas empleadas en atmosferas modificadas	124
V.1.6. Efectos metabólicos de las atmosferas modificadas	126
V.1.7. Factores que afectan las atmosferas modificadas	129
V.1.8. Justificación del tratamiento seleccionado	132
V.2. Objetivos	133
V.2.1. Objetivo general	133
V.2.2. Objetivos específicos	133
V.3. Materiales y métodos	134

V.3.1. Material vegetal	134
V.3.2. Almacenamiento	134
V.3.3. Tratamiento con atmósfera modificada pasiva (AMP)	134
V.3.4. Determinaciones	135
V.3.4.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño	135
V.3.4.2. Pérdida de electrolitos	135
V.3.4.3. Pardeamiento de la pulpa, potencial de oxidación y color de la piel	135
V.3.4.4. Fenoles y flavonoides	136
V.3.4.5. Capacidad antirradical	136
V.3.4.6. Medición de la actividad de lipoxigenasa	136
V.3.4.7. Ácidos grasos y fosfolípidos	136
V.3.4.8. Peroxidación de lípidos	136
V.3.4.9. Análisis estadístico	136
V.4. Resultados y discusión	138
V.4.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño	138
V.4.2. Pérdida de electrolitos	142
V.4.3. Pardeamiento de la pulpa, potencial de oxidación y color de la piel	144
V.4.4. Fenoles, flavonoides y capacidad antirradical	147
V.4.5. Medición de la actividad de lipoxigenasa	151
V.4.6. Ácidos grasos y fosfolípidos	152
V.4.7. Peroxidación de lípidos	156
V.5. Conclusiones	159
DISCUSIÓN GENERAL	161
CONCLUSIONES GENERALES	165
BIBLIOGRAFÍA	167

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ASPECTOS GENERALES DE LA BERENJENA

La berenjena (*Solanum melongena* L.) pertenece a la familia de las solanáceas y es originaria de las zonas tropicales y subtropicales asiáticas. Se cultivó desde muy antiguo en la India, Birmania y China. Hacia el año 1.200 ya se cultivaba en Egipto, desde donde fue introducida en la Edad Media a través de la Península Ibérica y Turquía, para posteriormente extenderse por el Mediterráneo y resto de Europa (Anónimo, 2003). Fue introducida en América por los conquistadores y cultivada en Brasil alrededor del año 1650 (Mangione y Sánchez, 1999).

Es una planta herbácea y anual, aunque puede rebrotar en un segundo año si se cuida y poda de forma adecuada, con el inconveniente de que la producción se reduce y la calidad de los frutos es menor. Sus tallos presentan tejidos lignificados que le dan un aspecto arbustivo (Anónimo, 2003).

Las flores son de color violáceo. Tanto el pedúnculo como el cáliz poseen abundantes espinas, aunque actualmente se tiende al cultivo de variedades sin espinas. Los estambres presentan anteras muy desarrolladas de color amarillo que se sitúan por debajo del estigma, dificultando la fecundación directa. El cáliz de la flor perdura después de la fecundación y crece junto al fruto, envolviéndolo por su parte inferior, lo que puede dar lugar a ataques de botritis (*Botrytis cinerea*) cuando la humedad relativa es elevada, ya que los pétalos quedan atrapados entre el cáliz y el fruto (Anónimo, 2003).

La mayor parte de las variedades florecen en ramilletes de tres a cinco flores, una de las cuales es hermafrodita, de pedúnculo corto y continuo, desde el tallo hasta el cáliz, y da lugar a un fruto comercial, mientras que el resto de las flores abortan o dan lugar a un fruto pequeño y de peor calidad. Normalmente la primera flor aparece en el vértice de la primera bifurcación o tallo principal de la planta. La fecundación de la flor es autógama, aunque también puede haber cruzamiento con flores de otras plantas e incluso de las misma planta (Anónimo, 2003).

El ciclo de la berenjena es de nueve a diez meses; desde que se planta hasta que se inicia la recolección suelen transcurrir 100 a 125 días, según las

variedades y la época de cultivo. La planta requiere estaciones largas y cálidas para una producción exitosa (Salunkhe y Desai, 1984).

Produce frutos con muchas formas diferentes, dependiendo del cultivar; el tamaño del fruto completamente desarrollado varía en un amplio rango, desde unos pocos gramos o centímetros a más de 1 kg o 60 cm de largo. Dichos frutos se caracterizan por tener un exocarpio delgado fusionado con el mesocarpio (Pantastico y col., 1979).

1.1. VARIEDADES

Los criterios de clasificación de los cultivares de berenjenas son varios. Así, por ejemplo, Mangione y Sánchez (1999) las clasifican, desde el punto de vista agronómico, de acuerdo a las siguientes características:

- ✓ Precocidad
- ✓ Color de los frutos
- ✓ Forma

Dentro de la primera clasificación encontramos las variedades tempranas y tardías según sea el período transcurrido desde que son plantadas hasta que entran en producción. Las primeras entran en producción luego de 4 meses mientras que las segundas se retrasan hasta 20 días.

Si utilizamos como criterio de clasificación el color del fruto podemos encontrar berenjenas violetas o negras, blancas y jaspeadas o veteadas. Sin embargo, el criterio de clasificación más utilizado es la forma de los frutos que permite distinguir entre 3 tipos fundamentales: larga, medio larga o semilarga y redonda.

Por otra parte, según Cantwell y Suslow (2000), en Estados Unidos se distinguen las siguientes variedades:

- Americana: de frutos firmes ovalado a globoso y piel color púrpura oscuro.
- Japonesa: elongada, delgada, color púrpura claro a oscuro, muy perecedera.

- Blanca: pequeña, de forma ovalada a globular y de piel delgada.
- Mini-japonesa: pequeña, elongada, con vetas de diferentes tonalidades de púrpura y violeta.
- China: elongada, delgada y de color púrpura claro.

Los cultivos más importantes comercialmente son los de color púrpura, especialmente en Asia y países mediterráneos. Así, en España los tipos más apreciados por el mercado son los de forma globosa y semilarga (Anónimo, 2003).

1.2. RECOLECCIÓN E ÍNDICES DE COSECHA

Las berenjenas se cosechan en diferentes estados de desarrollo. Dependiendo del cultivar y de la temperatura, el período de floración a cosecha puede ser de 10 a 40 días. El fruto de berenjena debe recolectarse antes de que las semillas empiecen a engrosar, ya que los frutos con semillas disgustan al paladar, no siendo necesario que el fruto haya alcanzado la madurez fisiológica. En el momento adecuado para su recolección el fruto presenta un aspecto brillante (Anónimo, 2003).

Es así que, los frutos para consumo humano se cosechan cuando están fisiológicamente inmaduros, mucho antes de que alcancen su tamaño, textura y color final como los pepinos y calabazas de invierno (Esteban y col. 1992). El punto de corte (“índices de madurez de cosecha”) de la berenjena se debe realizar cuando las semillas todavía no están formadas totalmente, la pulpa presenta un color blanquecino uniforme, los frutos manifiestan un color brillante y un aspecto terso en toda su superficie, con cáliz y pedicelo color verde, mientras que presentan un ligero reblandecimiento justo debajo del cáliz, y poseen un tamaño aproximadamente comprendido entre los 2/3 y los 3/4 de su desarrollo máximo, no coincidiendo estas condiciones con la madurez fisiológica (Mangione y Sánchez, 1999).

Los retrasos en la recolección llevan a la obtención de frutos de consistencia esponjosa y excesiva cantidad de semillas y su pulpa se vuelve

amarga cuando llega a la sobremadurez (Mangione y Sánchez, 1999; Cantwel y Suslow, 2000).

La cosecha se realiza manual y secuencialmente a medida que los frutos alcanzan el tamaño adecuado. Esto lleva desde 25 a 40 días después de la polinización (Ryall y Lipton, 1983). Normalmente el tiempo que media entre dos recolecciones consecutivas es de 5 a 10 días, dependiendo de las condiciones ambientales (Anónimo, 2003).

La mejor hora de recolección es por la mañana, cuando ya no hay rocío y antes del medio día en que el calor perjudica a los frutos. Se deben evitar las magulladuras al cosechar ya que los golpes, además de conferirle sabor amargo el fruto, son puerta de entrada de patógenos (Mangione y Sánchez, 1999). Se recomienda, asimismo, emplear tijeras de podar para no causar desgarros, dejando al menos un centímetro de pedúnculo (Anónimo, 2003)

Las berenjenas de alta calidad deben tener una superficie brillante con el color típico de la variedad, un cáliz fresco y sin manchas y estar libre de cualquier contaminación, decoloración u otro defecto. La frescura del cáliz es un parámetro muy importante de calidad y se considera generalmente que la apariencia del cáliz declina más rápidamente que la calidad de la fruta en sí misma (Molinar y col., 1996). La calidad típica de la berenjena tipo Americana se basa principalmente en su uniformidad de forma (ovalada a globosa), firmeza y color de la piel púrpura oscuro (Cantwell y Suslow, 2000).

1.3. FISOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE CRECIMIENTO

El período de crecimiento y maduración de los frutos depende, entre otros factores, de la variedad. Por ejemplo, para berenjenas Jaspeada semi-redonda, Larga morada y Redonda negra lisa éste se extendió más de 6 semanas después del cuajado de los frutos que alcanzaron su máximo crecimiento 2 semanas después (Esteban y col., 1993). Sin embargo, berenjenas Black nite iniciaron su período de expansión celular a partir del noveno día de la antesis reflejado por un brusco aumento de peso y volumen

alcanzando a los 13 días el tamaño óptimo para su comercialización (Rodríguez, 2000).

Si bien el contenido de antocianinas de la piel refleja diferencias significativas entre variedades, Mollá y col. (1990) encontraron, en las variedades antes mencionadas, un máximo en su concentración a los 28 días después del cuaje a partir de los cuales se verificó un descenso en su contenido coincidiendo con una progresiva decoloración. Resultados similares fueron obtenidos por Ranjan y Chakrabarti (2002) para 10 cultivares de berenjenas moradas.

El patrón respiratorio de berenjenas Black nite reveló una disminución progresiva hasta el quinto día de desarrollo incrementándose, posteriormente, los niveles de dióxido de carbono para alcanzar un máximo a los 9 días y descender nuevamente hasta los 11 días. Sin embargo, la producción de etileno disminuyó progresivamente no presentando ningún cambio asociado con el proceso de maduración lo que confirmó su comportamiento como fruto no climatérico (Rodríguez, 2000) coincidiendo con lo expresado por Fallik y col. (1995).

Cantwell y Suslow (2000) fijaron un rango de producción de etileno de 0,1-0.7 $\mu\text{l} / \text{kg h}$ a 12,5°C y una intensidad respiratoria variable con el tipo de berenjena tal como se observa en la siguiente tabla:

TIPO DE BERENJENA	INTENSIDAD RESPIRATORIA A 12,5°C [ml CO₂ / kg h]
Americana	30-39
Ovalada blanca	52-61
Japonesa	62-69

FUENTE: Cantwell y Suslow, 2000.

Esteban y col. (1992) determinaron que el contenido de azúcares, en las 3 variedades estudiadas, se debe principalmente a azúcares reductores constituidos por glucosa y fructosa. Observaron que, durante la evolución del fruto, se registró una acumulación de azúcares en los primeros días de

desarrollo, pero posteriormente la fruta comenzó una fase de crecimiento intensa con el consecuente consumo de éstos. Superada esta fase, los azúcares comenzaron a acumularse nuevamente. A las seis semanas existió un máximo de azúcares y las frutas alcanzaron su plenitud sensorial. Posteriormente, el contenido de azúcares disminuyó produciendo frutos de menor calidad comercial. Glucosa y fructosa también fueron los componentes mayoritarios de berenjenas Black nite encontrándose en mucha menor proporción sacarosa y maltosa. Durante la evolución de los frutos, la concentración de éstos mostró un continuo crecimiento alcanzando un máximo en coincidencia con la fase de crecimiento intenso para luego disminuir ligeramente (Rodríguez, 2000).

Las sustancias responsables del sabor, las características sensoriales y vitaminas de la fruta, tales como polifenoles alcanzaron su máximo valor cerca de los 42 días desde la aparición de los frutos en las variedades Jaspeada semi-redonda, Larga morada y Redonda negra lisa, no se encontrándose grandes diferencias en el comportamiento de los tres cultivares estudiados (Esteban y col., 1992). Comportamientos similares en el contenido de polifenoles totales fueron registrados por Ranjan y Chakrabarti (2002) en otros 12 cultivares.

Trabajos posteriores de Esteban y col. (1993), realizados con las mismas variedades, demostraron que durante el período de desarrollo los polisacáridos pécticos aumentaron mientras que las protopectinas disminuyeron. Durante la maduración, las pectinas de alto metoxilo comenzaron a disminuir debido a una nueva desesterificación enzimática que originó un incremento en las pectinas de bajo metoxilo. La protopectina fue una fracción importante que se incrementó antes de la madurez fisiológica y luego disminuyó con la maduración y ablandamiento de la fruta. Esta fracción, junto con otro material cementante, es responsable del mantenimiento de la textura.

En síntesis, durante el desarrollo y maduración de los frutos existe un punto de inflexión cuya duración depende del cultivar. Es posible, por lo tanto y según Esteban y col. (1992), considerar esta etapa como el momento en que la fruta alcanzó su madurez fisiológica.

1.4. CONDICIONES RECOMENDADAS DE CONSERVACION

1.4.1. TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA

La temperatura es el factor ambiental de mayor influencia en la velocidad de deterioro de los productos cosechados. Por cada incremento de 10°C por encima de la temperatura óptima la velocidad de deterioro se incrementa 2 o 3 veces (Kader, 2002a).

Asimismo, la velocidad de pérdida de agua de frutas y hortalizas depende de la humedad relativa (HR) del aire que rodea al producto. Esta pérdida representa no sólo un descenso de peso sino también una disminución del valor comercial del producto (Wills y col., 1998).

Las condiciones óptimas para el almacenamiento de berenjenas son: temperatura 10 – 12°C y HR: 90 – 95% (Anónimo, 2003; Cantwell y Suslow, 2000; Cantwell y Kasmire, 2002).

El período de almacenamiento de las berenjenas es generalmente inferior a 14 días debido a que la calidad visual y sensorial se deterioran rápidamente. También es probable que aumenten las pudriciones cuando se almacenan por más de 2 semanas (Anónimo, 2003).

1.4.2. SENSIBILIDAD AL ETILENO

Las berenjenas tienen una sensibilidad al etileno presente en el ambiente de moderada a alta. Cuando se les expone a más de 1 ppm de etileno durante la distribución y el almacenamiento a corto plazo, la abscisión del cáliz y el deterioro, particularmente el pardeamiento, pueden convertirse en un problema (Cantwell y Suslow, 2000; Cantwell y Kasmire, 2002).

Aunque tiene una baja producción de este gas, como el pimiento, el melón, el zapallo, la sandía y las berries, debe cuidarse de no exponer los frutos a otros productos que sí lo generan y que pueden estar presentes en la cámara o en el transporte. La exposición de estos frutos al etileno disminuye su tiempo de conservación de 14 días a 3-5 días (Anónimo, 2003).

1.4.3. ATMÓSFERAS CONTROLADAS O MODIFICADAS

El almacenamiento en atmósferas controladas (AC) o modificadas (AM) ofrece poco beneficio para la conservación de la calidad de las berenjenas. Las concentraciones bajas de O₂ (3-5%) retrasan por unos días su deterioro y el comienzo de pudriciones. Las berenjenas toleran hasta 10% CO₂ pero el incremento en la vida de almacenamiento no es superior al que se obtiene con concentraciones reducidas de O₂ (Cantwell y Suslow, 2000).

Sin embargo, el daño por frío y la pérdida de agua se pueden reducir almacenando las berenjenas en bolsas de polietileno u otras películas plásticas. Aunque un riesgo potencial de esta práctica es el aumento de la pudrición por *Botrytis* (Cantwell y Suslow, 2000).

1.5. DESÓRDENES Y ENFERMEDADES POSTCOSECHA

Según sea su etiología se puede establecer una diferencia entre las alteraciones que afectan a la berenjena en poscosecha. Así se define como **desorden** a toda alteración en el fruto que sea provocada por un factor abiótico (fisiológico, mecánico, etc.) y como **enfermedad** a todo defecto causado por un microorganismo patógeno ya sea hongo, bacteria o virus (Mangione y Sánchez, 1999).

1.5.1. DESÓRDENES

1.5.1.1. DAÑO POR FRÍO

La berenjena es una planta de origen tropical y por tanto sensible a las temperaturas pudiendo aparecer en sus frutos daños por enfriamiento o chilling injury (López-Andréu y col., 1988). Las berenjenas son sensibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 10°C (Anónimo, 2003; Cantwell y Suslow, 2000).

A 5°C el daño por frío se presenta en 6-8 días. Los síntomas son picado (depressiones en la superficie), bronceado superficial y pardeamiento de las semillas y pulpa. En frutas sujetas al estrés de esta fisiopatía es común el desarrollo acelerado de la pudrición por *Alternaria* spp. El daño por frío es acumulativo y puede iniciarse en el campo antes de la cosecha (Cantwell y Suslow, 2000).

La manifestación de esta fisiopatía depende del tipo de berenjena según manifiestan Cantwell y Suslow (2000) y se consignan en la siguiente tabla:

TIPO DE BERENJENA	Días para que los síntomas de daño por frío se vuelvan visibles			
	TEMPERATURA			
	0°C	2.5°C	5°C	7.5°C
Americana	1-2	4-5	6-7	12
Japonesa	---	5-6	8-9	12-14
China	2-3	5-6	10-12	15-16

FUENTE: Cantwell y Suslow, 2000.

1.5.1.2. DAÑO POR CONGELACIÓN

Se inicia a -0.8°C dependiendo del contenido de sólidos solubles totales. Los síntomas incluyen pulpa de apariencia vítrea, translúcida o acuosa que se torna parda y seca con el tiempo (Cantwell y Suslow, 2000).

1.5.1.3. DAÑOS FÍSICOS

Las magulladuras y daños por compresión son muy comunes cuando no se siguen las prácticas de manejo y cosecha recomendadas. Las berenjenas no pueden estibarse en recipientes a granel (cajas "pallet" de campo) sin sufrir daños por compresión (Cantwell y Suslow, 2000).

Los daños por rozamiento se manifiestan con áreas deprimidas con cicatrices que favorecen el desarrollo de patógenos secundarios (Mangione y Sánchez, 1999).

1.5.2. ENFERMEDADES

Las enfermedades son una causa importante de pérdidas postcosecha, particularmente en combinación con el daño por frío. Los hongos fitopatógenos más comunes son *Alternaria* (pudrición por moho negro), *Botrytis* (pudrición por moho gris), *Rhizopus* (pudrición algodonosa) y *Phomopsis* (Cantwell y Suslow, 2000).

Sin embargo, la mayor parte de estos microorganismos son débilmente patógenos en el sentido de que sólo pueden invadir productos dañados (Wills y col., 1998).

La pudrición algodonosa o mohosa es causada por *Rhizopus stolonifer*, un patógeno estricto de poscosecha, que sólo es capaz de penetrar al fruto a través de heridas. Se presenta como una mancha de color pardo que se extiende rápidamente. Generalmente la epidermis se mantiene intacta y los tejidos internos húmedos y blandos. Si la epidermis se rompe aparecen las fructificaciones del hongo de color oscuro (Mangione y Sánchez, 1999).

El agente causal de la pudrición por moho negro es *Alternaria tenuis*. Se manifiesta con manchas concéntricas oscuras verde-oliváceas. Las mismas evolucionan hacia el interior comprometiendo a todo el fruto. Generalmente ataca a tejidos debilitados y se difunde rápidamente cuando la temperatura y la humedad ambiente son elevadas (Mangione y Sánchez, 1999).

El agente causal del tizón es *Phomopsis vexans*, un patógeno frecuente en el cultivo de berenjena. Se observan manchas pequeñas, deprimidas que se oscurecen y se unen; debajo de éstas se advierte una podredumbre esponjosa. En las zonas afectadas se observa puntuaciones negras (picnidios) que son las fructificaciones del hongo (Mangione y Sánchez, 1999).

2. DAÑO POR FRÍO EN PRODUCTOS VEGETALES

El daño por frío es un desorden fisiológico que se presenta en muchos productos hortícolas cuando son expuestos a almacenamientos por debajo de ciertas temperaturas que son características de la especie particular (Purvis, 2002).

Este daño se manifiesta principalmente en productos de origen tropical o subtropical cuando son almacenados a temperaturas por encima de su punto de congelación y por debajo de 5 a 15°C dependiendo del vegetal (Kader, 2002a).

Si bien la susceptibilidad al daño por frío está generalmente asociada con productos de origen tropical y subtropical, los desordenes fisiológicos son también inducidos por la baja temperatura en algunos productos de origen templado tales como manzanas y peras (Purvis, 2002).

El daño por frío es el principal problema en el manejo de vegetales, debido a que impide el almacenamiento de muchos productos a temperaturas, que de otra manera, prologarían su vida en forma considerable (Pantástico y col., 1979).

2.1. SÍNTOMAS DEL DAÑO POR FRÍO

Los síntomas físicos más comunes del daño por frío son decoloraciones internas y superficiales (pardeamiento), punteado, áreas de aspecto acuoso, maduración despareja o imposibilidad de maduración, desarrollo de sabores no característicos y mayor incidencia de hongos y podredumbres (Kader, 2002a).

Estos síntomas frecuentemente no se desarrollan hasta que el producto es transferido a mayor temperatura (Purvis, 2002) o bien son más notables luego de la transferencia (Kader, 2002a).

El punteado de la piel se debe usualmente al colapso de las células situadas debajo de la superficie y generalmente va acompañado de decoloraciones. Estas áreas dañadas pueden incrementar la pérdida de agua que generalmente acentúa la extensión del punteado (Wills y col., 1998).

Las manifestaciones fisiológicas del daño por frío generalmente preceden u ocurren concomitantemente con la aparición de síntomas visibles e incluye velocidades incrementadas de producción de etileno, respiración e intercambio de iones (Purvis, 2002).

La amplia variedad de síntomas sugiere que en el desarrollo del daño por frío intervienen diversos factores; es digno de resaltar, por ejemplo, que los productos idénticos procedentes de distintas áreas geográficas se comportan de modo distinto y que las variedades de una misma cosecha pueden responder también de modo diferente al someterlas a una determinada temperatura (Wills y col., 1998).

Asimismo, el daño por frío está relacionado con las temperaturas de crecimiento; esto es, frutos de climas cálidos son más susceptibles al daño que los que crecen en climas más fríos (Ryall y Lipton, 1983; Saltveit, 2003a).

Por otra parte, la extensión del daño es función tanto de la temperatura como de la duración de la exposición. (Purvis, 2002; Saltveit, 2003a)

2.2. MECANISMOS DEL DAÑO POR FRÍO

Los acontecimientos que conducen al daño por frío pueden separarse en eventos primarios, por los cuales las células vegetales perciben la baja temperatura, y las respuestas a largo plazo (eventos secundarios) que finalmente conducen a la muerte celular (Wills y col., 1998). El evento primario es un efecto físico reversible que ocurre instantáneamente a una temperatura umbral, mientras que los eventos secundarios son efectos metabólicos bioquímicos producidos por el evento primario que producen el daño irreversible (Whitaker, 1995) que se manifiesta como necrosis varias u otros síntomas del daño por frío (Wills y col., 1998).

La mayoría de las hipótesis sobre los mecanismos del daño por frío sugieren que las membranas son el sitio probable de los primeros efectos del enfriamiento (Lyons y col., 1979; Raison y Orr, 1990). Numerosos estudios de cambios estructurales asociados con el desarrollo de este daño también

implicaron a las membranas celulares como los sitios primarios (Parkin y col., 1989).

Wills y col. (1998) refiere como causas más probables de la sensibilidad de los vegetales al frío las siguientes:

- el cambio inducido por la baja temperatura en las propiedades físicas de las membranas celulares debido a cambios en el estado físico de los lípidos de membrana; y,
- la disociación de enzimas y otras proteínas en subunidades inducida por la baja temperatura que ocasionan cambios en la actividad enzimática y en proteínas estructurales tales como la tubulina.

Por otra parte, en los últimos años, ha cobrado vigencia la idea de la participación de las especies reactivas del oxígeno en los daños ocasionados a membranas y fotosistemas en situaciones de estrés como lo es el daño por frío (Purvis y col., 1995).

2.2.1. TEORÍA DE LAS PROTEÍNAS

Existen evidencias, a partir de estudios realizados tanto en animales como en vegetales, de que varias enzimas del metabolismo celular sufren una disociación a temperaturas cercanas a 0°C. Así, algunas enzimas multiméricas se desdoblán en sus subunidades componentes con la consecuente pérdida de la actividad enzimática y el cambio en algunas propiedades cinéticas que provocan un desbalance metabólico que conduciría a la muerte celular. Ejemplo de ello serían las proteínas estructurales del citoesqueleto, como la tubulina, que son lábiles a bajas temperaturas y se disocian (Wills y col., 1998).

Las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido pueden ser perturbadas por las bajas temperaturas que disminuyen la fuerza relativa de los enlaces hidrofóbicos. El debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas puede explicar el porqué de las disfunciones de enzimas solubles y su consecuente

disociación en subunidades y/o desdoblamiento en polipéptidos. Asimismo, puede ser una razón de la disfunción producida en enzimas de membrana que participan en interacciones termosensibles con los lípidos. Por ejemplo, se sugiere que la ATPasa de membrana plasmática está influenciada directamente por la temperatura, tanto la proteína misma como en su interacción proteína-lípido. Puesto que hay una conformación proteica óptima para la actividad normal de la enzima, la solidificación de los lípidos de membrana a bajas temperaturas inhibiría la actividad enzimática induciendo a cambios conformacionales en la proteína tal como se esquematiza en la Figura 1 (Parkin y col., 1989).

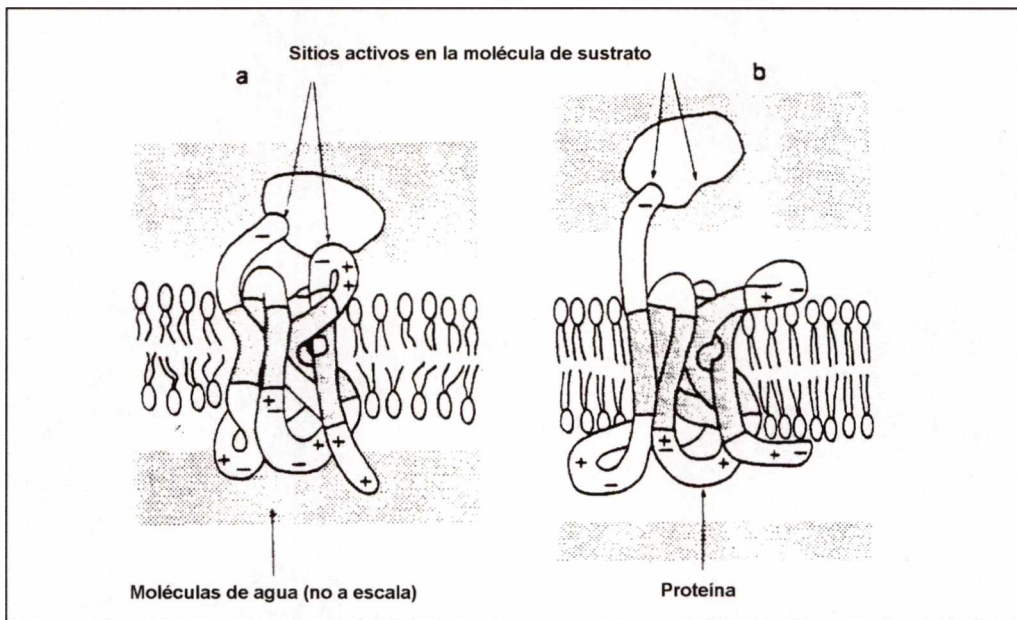


Figura 1. Versión altamente idealizada de una proteína intrínseca en una bicapa lipídica (a) los lípidos en estado fluido y su capacidad de deformación permite a las regiones hidrofóbicas de las proteínas adoptar libremente la conformación requerida para su óptima combinación con el sustrato; (b) lípidos en la fase gel; la región hidrofóbica más rígida y gruesa deforma las áreas hidrofóbicas de la proteína. La fase acuosa ordenada se distancia y el campo eléctrico es más fuerte por lo que la proteína se deforma y adopta el estado energético más bajo posible. En este estado deformado no puede formar un complejo activado con la molécula de sustrato (Extraído de Parkin y col., 1989).

Sin embargo esta teoría no ha sido considerada en la misma profundidad que la teoría de transición de fase y se considera como una consecuencia de ésta (Parkin y col., 1989).

2.2.2. TEORÍA DE LA TRANSICIÓN DE FASE

Lyons y Raison (1970) fueron los primeros en proponer una transición en el ordenamiento molecular de los lípidos de membrana como primer evento que causa el daño por frío. Postularon que una transición de los lípidos de membrana de una fase líquido-cristalina a una fase gel-sólida conduce a desbalances metabólicos, pérdida de la compartimentalización celular, incremento en la permeabilidad de la membrana e intercambio de iones y la estimulación de la producción de etileno y la velocidad de respiración, resultando en el desarrollo de una variedad de síntomas de daño por frío (Lyons, 1973).

Esta hipótesis ha sido sostenida durante años y es la más aceptada en la actualidad.

Datos obtenidos, relacionados con la hipótesis lipídica, muestran que existe un cambio en las propiedades físicas de los lípidos de membranas a determinadas temperaturas dentro del rango de 7-15°C. Se encontró que estas temperaturas coinciden con las temperaturas críticas por debajo de las cuales los tejidos vegetales manifiestan síntomas de daño por frío. Si bien se ha demostrado que solo una pequeña proporción (menos 10%) de los lípidos sufre el cambio de fase, este cambio físico modificaría las propiedades de las membranas. Así, se verían afectados tanto el movimiento de iones y metabolitos como las actividades de las enzimas asociadas a la membrana. Estos cambios podrían, a su vez, causar desbalances metabólicos con la eventual disrupción de las membranas llevando a la ruptura de la compartimentalización celular, muerte de las células y aparición de los síntomas del daño por frío (Wills y col., 1998).

Sin embargo, esta teoría también ha sido atacada, discutida y criticada. La principal crítica es que es difícil que una mezcla heterogénea de lípidos de

membranas vegetales que contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados sufra una transición abrupta a una temperatura por encima de 0°C (Bishop, 1986; Minorsky, 1985).

Lo que puede considerarse un refinamiento de la teoría de transición de fase (Parkin y col., 1989) es que la bicapa lipídica de la membrana puede sufrir una continua transición de fase a una temperatura crítica en la que se formarían micelas inversas que se transformarían posteriormente en micelas inversas tubulares o de empaquetamiento cerrado que culminarían en estructuras lipídicas hexagonales de tipo II o bien cúbicas, tal como se esquematiza en la Figura 2.

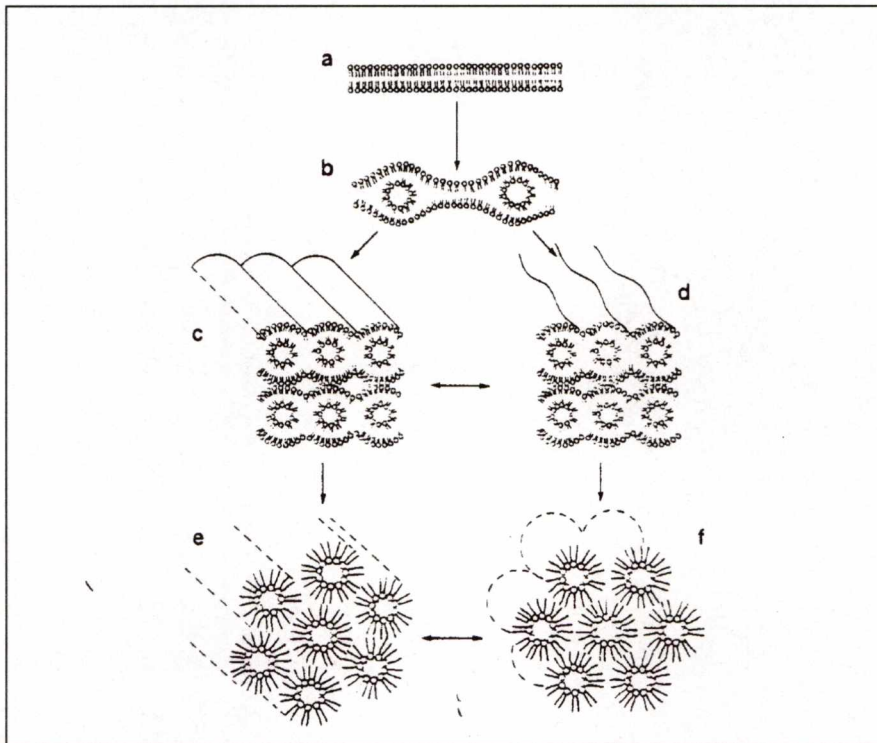


Figura 2. Arreglos moleculares de las estructuras de lípidos de membrana (a) lamela; (b) micelas invertidas; (c) micelas invertidas tubulares; (d) arreglo compacto-cerrado de micelas invertidas en la bicapa; (e) arreglo hexagonal tipo II; (f) arreglo cúbico (Extraído de Parkin y col., 1989).

Estas estructuras producirían una separación de fase en las membranas que causarían perturbaciones estructurales cuyas consecuencias serían la pérdida de la permeabilidad y la agregación proteica de las mismas. Estos

cambios serían irreversibles aún cuando el tejido fuera transferido a temperaturas fisiológicas (Parkin y col., 1989).

La presencia de pequeñas áreas de lípidos en fase gel en la membrana plasmática puede ser suficiente para iniciar la cascada de reacciones catabólicas que resultan en el daño por frío (Wang y col., 1992).

Por otra parte, se ha propuesto también que la disrupción de la estructura y función de la membrana debido al daño por frío iniciaría una cascada en el catabolismo lipídico análoga a la que ocurre durante la senescencia normal (Parkin y col., 1989; Thompson, 1984a). Este esquema propone una hidrólisis secuencial y peroxidación de fosfolípidos y los catabolitos resultantes serían los que causarían la alteración de las propiedades físicas de la membrana y la actividad enzimática (Whitaker, 1995).

2.2.3. TEORÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico. Se producen generalmente como resultado de la excitación del O_2 para formar oxígeno singlete (1O_2) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al oxígeno para formar radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxilo (HO^*), respectivamente. Estas sustancias son capaces de oxidar varios componentes celulares y pueden ocasionar la destrucción oxidativa de la célula (Mittler, 2002).

Existen muchas fuentes potenciales de ROS en los vegetales. Así, se generan durante el curso del metabolismo oxidativo normal (fotosíntesis y respiración) o su producción puede verse exacerbada durante situaciones de estrés abióticos tales como déficit de agua y estrés térmico (Whitaker, 2003).

Si bien el nivel basal de ROS puede ser usado por los vegetales para monitorear su grado de estrés, este nivel debe mantenerse bajo estricto control debido a que una sobreacumulación de ROS puede ocasionar la muerte celular. Dicha muerte puede resultar de procesos oxidativos tales como peroxidación de lípidos de membrana, oxidación de proteínas, inhibición enzimática y daños del ADN y ARN (Mittler, 2002).

Así, el daño por frío estaría mediado, en parte, por estas especies que causarían daños secundarios a membranas y fotosistemas. La activación del oxígeno por los fotosistemas, en presencia de luz excesiva, es probablemente el sitio principal para la producción de radicales libres en hojas. En tejidos no fotosintéticos otros sistemas de transporte de electrones, como los que ocurren en mitocondrias o plasmalemma, pueden contribuir a su formación. Existe evidencia experimental que indica que las mitocondrias son las principales fuentes de superóxido en tejidos vegetales sensibles al daño por frío (Purvis y col., 1995).

De acuerdo con la terminología de Raison y Lyons (1986), el estrés oxidativo podría ser considerado como una respuesta secundaria a una lesión primaria en un sistema enzimático redox (Mc Kersie, 1996).

Dentro de este esquema, Shewfelt y Erickson (1991) proponen que la peroxidación de lípidos podría alterar las propiedades físicas de los lípidos de membrana y, por lo tanto, inhibir la función de proteínas ligadas a membranas contribuyendo al desarrollo de los síntomas visuales del daño. Este mecanismo tiene en cuenta la cinética del proceso del daño por frío asumiendo que, a bajas temperaturas, las reacciones de iniciación ocurren reversiblemente y por debajo del límite de detección; y que las reacciones de propagación no se hacen evidentes hasta que el tejido es transferido a temperaturas superiores. Solamente si las reacciones de propagación exceden la capacidad de los antioxidantes, el daño se hace irreversible.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la baja temperatura sobre el desarrollo del daño por frío en berenjenas Black nite y observar la influencia de su almacenamiento en atmósferas modificadas pasivas como tratamiento para retardar su manifestación.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la evolución de los síntomas del daño por frío en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C.
- Investigar la evolución de compuestos antioxidantes y su actividad en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C.
- Caracterizar la actividad de lipoxigenasa de la pulpa de berenjenas Black nite y analizar la variación de su actividad durante el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas.
- Analizar el deterioro de las membranas de berenjenas Blake nite sometidas a daño por frío evaluando los cambios en la composición lipídica y estudiando su estado de peroxidación.
- Investigar el efecto del almacenamiento en atmósfera modificada pasiva en la reducción o retardo de la incidencia del daño por frío en berenjenas Black nite y comparar los parámetros analizados con los de los frutos que sólo fueron refrigerados.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DEL DAÑO POR FRÍO EN BERENJENAS

I. 1. INTRODUCCIÓN

I. 1.1. DAÑO POR FRÍO

Daño por frío (chilling injury) es un término usado para describir el daño fisiológico que ocurre en muchas frutas y hortalizas como resultado de la exposición a bajas temperaturas (Parkin y col., 1989). Este daño se manifiesta en algunos vegetales, principalmente de origen tropical y subtropical, que se mantienen a temperaturas por encima de su punto de congelación y por debajo de 5° a 15°C, dependiendo del producto (Kader, 2002a). Así, por ejemplo, la exposición prolongada de tomates verde-maduros a temperaturas por debajo de 12°C induce daño por frío (Côté y col., 1993).

La temperatura por debajo de la cual se manifiesta el daño por frío se conoce como temperatura crítica.

Entre las frutas y hortalizas, el daño por frío es el causante de grandes pérdidas económicas durante el almacenamiento y transporte (Pantástico y col., 1979).

Los principales síntomas visibles del daño son pardeamiento, escaldado superficial, punteado, piel marchita, etc. Difieren según el producto y varían de acuerdo con el tejido afectado. Un síntoma común consiste en la aparición de manchas en la piel, debido al colapso y la decoloración de las células situadas inmediatamente debajo de la superficie (Wills y col., 1998).

Los síntomas del daño por frío aparecen generalmente mientras el producto se encuentra a bajas temperaturas; pero, en ocasiones, sólo se manifiesta cuando el producto es transferido de la baja temperatura a una temperatura mayor (Wills y col., 1998).

La extensión del daño visible no sólo es función de la temperatura, la especie vegetal y las condiciones morfológicas y fisiológicas del material vegetal, sino también de la duración de la exposición a las bajas temperaturas (Lyons y col., 1979).

Por otra parte, dicho daño es reversible si la exposición a la baja temperatura es breve. La disfunción fisiológica que resulta de los cambios

moleculares inducidos por las bajas temperaturas pueden ser revertida (o reparada) si el tejido es transferido a temperaturas a las que no se produce el daño antes de que éste realmente ocurra (Lyons y col., 1979).

Puesto que las berenjenas son sensibles a esta fisiopatía a temperaturas inferiores a 10°C, Cantwell y Suslow (2000) recomiendan temperaturas y humedades relativas óptimas de conservación de 10-12°C y 90-95% respectivamente alcanzándose con estas condiciones períodos de almacenamiento inferiores a los 14 días. Asimismo, estos autores indican que el daño se presenta en 6-8 días cuando los frutos son almacenados a 5°C.

En las berenjenas, los principales síntomas visuales de daño descritos son áreas marrones y decoloradas, punteado superficial que conduce a grandes áreas deprimidas, decoloración del cáliz, pardeamiento de semillas y pulpa y olor no característico (Cantwell y Kasmire, 2002).

I. 1.2. PÉRDIDA DE ELECTROLITOS

Existen numerosos síntomas del daño por frío en frutas y vegetales que pueden atribuirse a la alteración de biomembranas (Murata y Tatsumi, 1979) lo que podría alterar su permeabilidad.

Así, Lieberman y col. (1958) fueron los primeros en reportar que la velocidad de pérdida de iones, principalmente potasio, en discos de batata se incrementaba cuando se almacenaban a 7,5°C.

Por otra parte, el daño por frío al causar daños en la membrana celular ocasiona la pérdida de electrolitos que puede ser determinada midiendo la conductividad eléctrica de lixiviados de tejidos (Côté y col., 1993). Esta pérdida de electrolitos es considerada generalmente como una medida indirecta del daño de la membrana celular vegetal (Furmanski y Buescher, 1979; King y Ludford, 1983; Wang, 1989; Woods y col., 1991).

Numerosos estudios de permeabilidad de tejidos sensibles muestran un incremento en la velocidad y/o porcentaje de intercambio de electrolitos (Murata y Tatsumi, 1979; Côté y col., 1993; Saltveit, 2002; Kuo y Parkin, 1989; etc.). Dicho intercambio iónico, que se correlaciona con la aparición de

En raíces de jicama, la blancura de la pulpa es una característica importante de calidad y pueden producirse pardeamientos causados por daño por frío y senescencia (Cantwell y col., 2002).

I . 2. OBJETIVOS

I . 2.1. Objetivo general

Estudiar la evolución de los síntomas del daño por frío en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C.

I . 2.2. Objetivos específicos

A partir del objetivo general, se fijaron los siguientes objetivos específicos para el presente capítulo:

- a) Caracterizar los síntomas del daño por frío en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C y estudiar su evolución durante el almacenamiento refrigerado.
- b) Evaluar la variación de la pérdida de electrolitos con el daño por frío en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C y compararla con los valores correspondientes a frutos testigos almacenados a 20°C.
- c) Analizar la evolución de los parámetros de color durante el almacenamiento refrigerado de berenjenas Black nite.

I . 3. MATERIALES Y MÉTODOS

I . 3.1. Material vegetal

Se trabajó con berenjenas del cultivar Black nite provenientes de una finca ubicada en la localidad de La Dársena del Departamento Banda, Provincia de Santiago del Estero, Argentina.

Los frutos se cosecharon manualmente, en horas tempranas de la mañana, con grado de madurez comercial correspondiente a un peso de 300 – 400 g. Las berenjenas se seleccionaron según forma, tamaño y ausencia de defectos.

Una vez en el laboratorio, los frutos se lavaron con agua clorada, se escurrieron y se dejaron secar.

I . 3.2. Almacenamiento

Los frutos se envasaron individualmente en bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) perforadas (190 perforaciones/m² de 13 mm de diámetro) para permitir un buen intercambio gaseoso. Posteriormente se conservaron a 3°C durante 12 a 17 días, usándose como testigo frutos almacenados a 20°C.

Se extrajeron muestras compuestas de cinco frutos cada una a los 0,5, 1, 2 y 3 días y, posteriormente, cada 3-5 días. Para tiempos de almacenamiento iguales y superiores a los 3 días, una muestra de las berenjenas que permanecieron a 3°C, fue transferida a 20°C durante 48 horas para simular condiciones de venta.

I . 3.3. Determinaciones

I . 3.3.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño

Inmediatamente a la salida de la cámara y luego de mantenerse durante 48 h a 20°C, los frutos se evaluaron, en forma visual, a fin de determinar la

presencia de síntomas externos e internos de daño por frío y el nivel de éste alcanzado.

La evaluación del índice de daño (ID) se realizó utilizando una escala numérica subjetiva del 1 al 5, diseñada especialmente y que se muestra en la Tabla I.1.

Asimismo, para cada muestra se calculó el índice de daño definido de la siguiente manera:

$$ID = \frac{\sum (n_i \times \text{puntaje})}{N}$$

donde:

n_i : número de frutos de cada puntaje;

N : número total de frutos de cada tiempo y tratamiento.

Tabla I.1: Escala numérica usada para describir la intensidad del daño por frío en berenjenas almacenadas a 3°C basada en observaciones visuales internas y/o externas de los frutos.

Puntaje	Severidad del daño	Síntomas
1	Ninguno	No visibles.
2	Incipiente	Cáliz verde con pocas lesiones superficiales. Puntado incipiente.
3	Moderado	Lesiones de tamaño pequeño a medio (zonas escaldadas de color pardo con depresiones superficiales). Ligero oscurecimiento de la pulpa. Frutos ligeramente deteriorados. Distribución heterogénea del daño entre los frutos.
4	Severo	Lesiones superficiales grandes, extendidas en un área superficial no mayor a 1/3 del fruto, de color pardo oscuro. Moderado oscurecimiento de la pulpa. Frutos deteriorados no comercializables.
5	Muy severo	Áreas superficiales grandes necrosadas. Oscurecimiento de la pulpa y las semillas. Apariencia acuosa de la pulpa. Severo deterioro de los frutos.

Para ID mayores a 2,5 los frutos presentaban ya daños considerables y, por lo tanto, no eran comercializables.

I . 3.3.2.- Pérdida de electrolitos

La determinación de la pérdida de electrolitos se realizó a través de la medición de la conductividad eléctrica.

Para ello se extrajeron, con un sacabocado, discos de 13 mm de diámetro y 2 mm de espesor de la región ecuatorial de cada fruto y se les retiró la piel. Una muestra representativa del tejido, aproximadamente 2 g, fue lavada repetidamente con abundante agua bidestilada, colocada en un erlenmeyer y cubierta con 100 ml de solución de manitol 0,4 M. La solución se incubó durante 4 horas a 25°C y se leyó su conductividad. Posteriormente, tejido y manitol se autoclavaron a 121°C durante 30 minutos, a fin de liberar todos los electrolitos, se enfrió a 25°C y se determinó la conductividad de los electrolitos totales sobre las mismas muestras.

Cada determinación se realizó por triplicado empleándose para ello un conductímetro ANTARES III.

La pérdida de electrolitos se expresa en porcentaje de electrolitos totales.

I . 3.3.3. Pardeamiento de la pulpa

Utilizando un colorímetro Minolta CR-300, se midió el parámetro L^* en rodajas recién cortadas de 0,5 cm de espesor. Dichas rodajas se obtuvieron de la zona ecuatorial de cada fruto muestreado (5 frutos / muestra) y las mediciones se realizaron sobre cuatro puntos equidistantes de la misma.

Los resultados se expresan como L_0 .

I . 3.3.4. Potencial de oxidación

Se midió el parámetro L^* , al cabo de 30 minutos de cortadas, en los mismos puntos de las rodajas obtenidas según se describió en el ítem anterior, a fin de evaluar el potencial de oxidación (ΔL).

Dicho valor se expresa según la siguiente relación:

$$\Delta L = (L_0 - L_{30 \text{ min.}})$$

I . 3.3.5. Color de la piel

La medición del color superficial se realizó en cuatro puntos equidistantes sobre la zona ecuatorial de los frutos enteros muestreados.

Se midieron y calcularon las siguientes variables:

L*	(Luminosidad)	=	equilibrio entre negro (0) y blanco (100)
a*		=	equilibrio entre verde (-a) y rojo (+a)
b*		=	equilibrio entre azul (-b) y amarillo (+b)
Cr	(Croma)	=	$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ = grado de saturación del color
Hue		=	$\arctg(b^*/a^*)$ = color

Las determinaciones se realizaron con un colorímetro Minolta modelo CR-300.

I . 3.3.6. Análisis estadístico

Las experiencias se realizaron según un diseño factorial, siendo los factores la temperatura y el tiempo de almacenamiento, llevándose a cabo por lo menos cuatro ensayos de almacenamiento a 3°C.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA) de los resultados comparándose las medias con el test LSD para un nivel de significancia (α) igual a 0,05 utilizándose el software estadístico SPSS 10.0.

I . 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I . 4.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño

Los principales síntomas visuales del daño por frío en berenjenas fueron punteado superficial, lesiones caracterizadas por zonas escaldadas de color pardo con depresiones superficiales (que se acentuaron y extendieron a medida que aumentó el tiempo de exposición a las bajas temperaturas), marchitamiento y oscurecimiento del cáliz y pardeamiento de pulpa y semillas.

En la Figura I.1 se muestra una fotografía de las berenjenas conservadas por 12 días a 3°C, donde se observan los síntomas antes descriptos.



Figura I.1. Aspecto de las berenjenas Black nite al cabo de 12 días de almacenamiento a 3°C.

Estos síntomas coinciden con los descriptos para diferentes variedades de berenjenas (Fallik y col., 1995; Molinar y col., 1996; Cantwell y Suslow, 2000).

El primer signo visible del daño por frío se manifestó ya al cabo de los 3 días de almacenamiento a 3°C con la aparición de punteado en la superficie. A medida que avanzó el tiempo de almacenamiento aparecieron pequeñas depresiones pardas que se extendieron sobre toda la superficie de los frutos acompañadas, cuando el daño fue muy severo, del oscurecimiento de pulpa y semillas. Asimismo, el cáliz fue adquiriendo aspecto marchito y color verde grisáceo.

Lopez-Andréu y col. (1988) registraron la aparición de escaldadura, decoloración y pérdida de brillo en berenjenas luego de 18 días de conservación y Esteban y col. (1989b) observaron la aparición de punteado superficial luego de 13 días de almacenamiento de frutos del cv. Black Roud conservados a 5°C.

Por otra parte, Fallik y col. (1995) observaron la aparición de daño por frío recién a los 10 días de almacenamiento a 6°C en berenjenas cv. Classic cosechadas en primavera; mientras que Molinar y col. (1996) notaron niveles de daño moderado a los 7 días de almacenamiento a 0° y 2,5°C en berenjenas cv. Black Bell conservadas en bolsas de polietileno ventiladas extendiéndose ese período a 14 días cuando los frutos se almacenaron a 5°C.

En todos los casos, los síntomas fueron más marcados luego de que los frutos fueron transferidos a 20°C durante 48 horas, tal como puede observarse en la Figura I.2. En ésta se muestran berenjenas de igual período de almacenamiento en frío que el de la figura anterior a las que se las transfirió a 20°C durante 48 horas.

Las berenjenas testigos, almacenadas a 20°C, al cabo de 12 días de almacenamiento presentaron signos evidentes de senescencia caracterizados por su cáliz marchito, color pardo grisáceo, con desarrollo incipiente de hongos, consistencia blanda y superficie arrugada tal como puede observarse en la Figura I.3. Sin duda, este daño por sobremaduración trajo como consecuencia frutos no aptos para su comercialización.

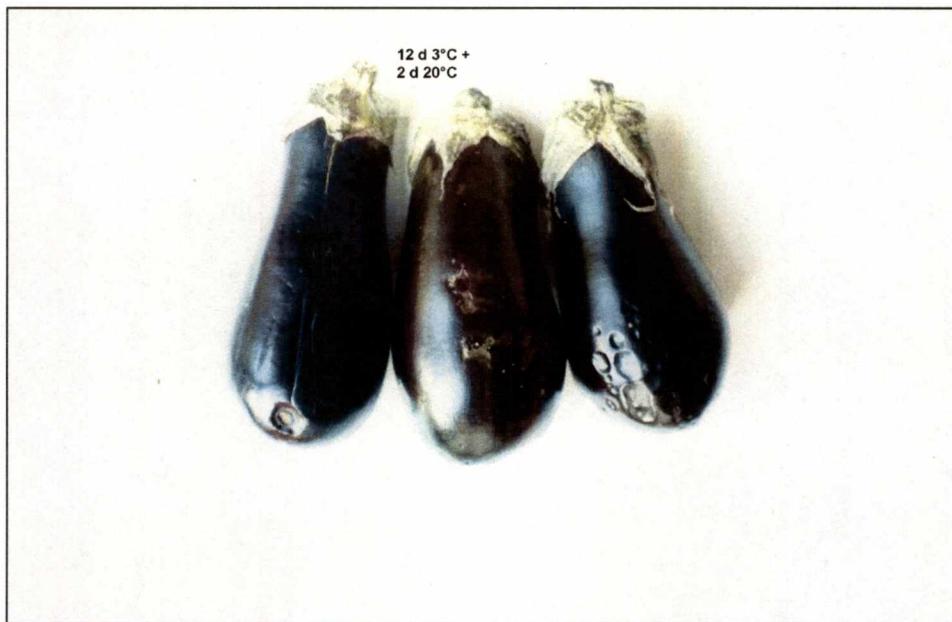


Figura I.2. Aspecto de las berenjenas Black nite al cabo de 12 días de almacenamiento a 3°C y transferidas durante 2 días a 20°C.



Figura I.3. Aspecto de las berenjenas Black nite al cabo de 12 días de almacenamiento a 20°C.

Sigrist (1984a) observó que en berenjenas cv. Black Bell almacenadas a 12,5°C o temperaturas superiores comenzaron a desarrollarse hongos sobre sus cálices, éstos se oscurecían y aparecían lesiones necróticas en la zona de unión del cáliz al fruto que se transformaban en áreas con aspecto acuoso y se extendían a todo el fruto. Por otra parte, Jha y Matsuoka (2002) apreciaron una disminución significativa en la consistencia de berenjenas cv. Ryoma con el tiempo de almacenamiento a 20°C.

En la Figura I.4. se grafica la evolución del índice de daño en función del tiempo de almacenamiento para berenjenas conservadas a 3°C y luego de transferidas a 20°C por 48 horas.

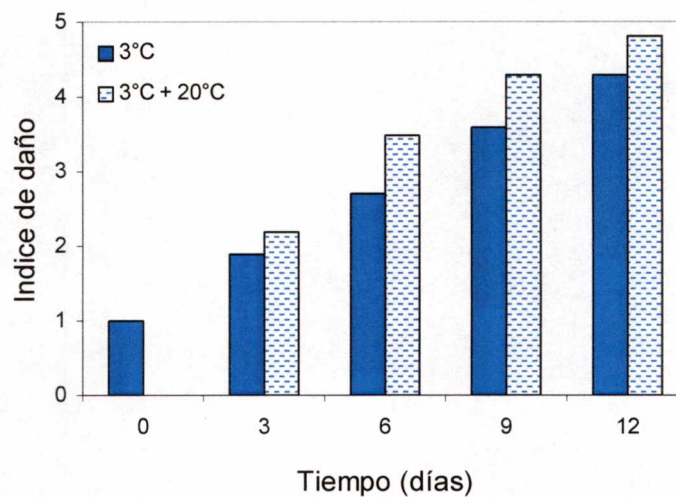


Figura I.4. Evolución del índice de daño de berenjenas Black nite almacenadas a 3°C y de frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 0,64$.

Tal como se observa en la misma, el índice de daño aumentó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento a 3°C, siendo superior luego del pasaje a 20°C.

Cuando los frutos alcanzaron un ID igual a 2,5 presentaron síntomas que los tornaron no comercializables. Estos valores se alcanzaron a 6 días de almacenamiento a bajas temperaturas.

Kozukue y col. (1979) notaron, también, que los síntomas de daño por frío se acentuaron cuando frutos cv. Hyonaga fueron transferidos a 20°C luego del almacenamiento a 1°C. Resultados similares fueron reportados por Sigrist (1984b) para berenjenas cv. Black Bell almacenadas a 2,5° y 7,5°C.

Asimismo, el incremento del nivel de daño por frío con el pasaje a temperaturas más altas fue informado por diferentes autores para otros productos sensibles; entre ellos podemos citar pimientos (Purvis, 2002) y mango (Phakawatmongkol y col., 2004).

I . 4.2. Pérdida de electrolitos

El aumento en la permeabilidad de la membrana y en las velocidades de intercambio iónico están asociadas con el daño por frío de tejidos sensibles, aún cuando el incremento observado en la permeabilidad generalmente ocurre luego de un enfriamiento prolongado (Saltveit, 2002).

Numerosos trabajos han examinado el efecto del enfriamiento en la permeabilidad de las membranas (Murata y Tatsumi, 1979; Kuo y Parkin, 1989, entre otros) y presentaron datos indicando que un incremento en el intercambio iónico ocurre en tejidos sensibles cuando se mantienen a una temperatura fría (Saltveit, 2002).

En nuestros ensayos, tal como puede verse en la Figura I.5., los valores de pérdida de electrolitos de los frutos almacenados a 3°C permanecieron constantes en el tiempo ($p > 0,05$) manifestando un aumento significativo en los valores obtenidos sólo en los últimos días de almacenamiento cuando los frutos han alcanzado un nivel de daño importante. Así, los valores de pérdidas de electrolitos obtenidos al cabo de 17 días de almacenamiento fueron, aproximadamente, un 30% mayor con respecto a los valores obtenidos para el tiempo 0. Sin embargo, Murata y Tatsumi (1979) notaron que en berenjenas los valores siguieron la misma tendencia que en pimiento donde no observó incremento durante el almacenamiento a 2°C o 12,5°C.

Estudios cinéticos del intercambio iónico de discos de pericarpio de tomate mostraron que el incremento de permeabilidad se desarrolló lentamente

durante el enfriamiento y que se necesitaron varios días de frío para que las velocidades de intercambio sean significativamente mayores a las de los controles no refrigerados (Saltveit, 2002)

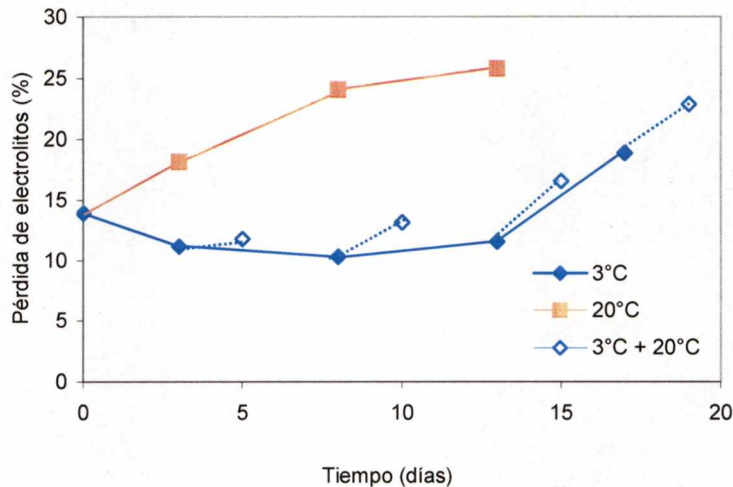


Figura 1.5. Variación de la pérdida de electrolitos en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C, 20°C y frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 4,22$.

A partir del día 13 de almacenamiento, se registraron diferencias significativas en el pasaje a 20°C siendo estos valores mayores que los obtenidos para 3°C. Dichos incrementos superaron el 20% para tiempos de almacenamiento iguales o superiores a los 13 días.

Sin embargo, Côté y col. (1993) encontraron que la pérdida de electrolitos disminuyó después que distintas variedades de tomate eran retornadas a 20°C por 4 o 7 días luego de un almacenamiento a 3°C.

Kuo y Parkin (1989) informaron que en pepinos cv. Carolina el porcentaje de electrolitos perdidos comenzó a aumentar a partir de los 7 días de almacenamiento a 4°C y las frutas no refrigeradas mostraron solo un moderado incremento en estos valores para los mismos períodos de almacenamiento. Las frutas transferidas a 14°C durante 8 días no manifestaron incrementos en este parámetro sino hasta después de 10 – 18 días de almacenamiento siguiendo una tendencia similar a las continuamente refrigeradas.

En los frutos testigo, almacenados a 20°C, se registró un aumento asintótico del porcentaje de pérdidas de electrolitos debido a su maduración. Si comparamos los valores a los 13 días de almacenamiento con los correspondientes al tiempo 0, los resultados indican que prácticamente se ha duplicado.

En todos los casos, los valores obtenidos a 20°C superan a los correspondientes a 3°C; así, a los 8 y 13 días de almacenamiento las pérdidas de electrolitos son más del doble a 20°C que a 3°C. Esta tendencia coincide con lo informado para otros productos. En el caso de tomate, Côté y col. (1993) registraron valores aproximadamente 1,5 veces superiores a 12,5°C que a 3°C a partir del octavo día de almacenamiento y Bergevin y col. (1993) obtuvieron tendencias similares.

Representando el porcentaje de pérdida de electrolitos en función del ID, tal como se muestra en la Figura 1.6., observamos que esta medida es indicativa del daño por frío alcanzado por los frutos cuando el ID supera un determinado nivel. Los resultados encontrados indican que dichos porcentajes superan el 30% cuando los frutos alcanzaron ID superiores a 2,5. A partir de ese valor de ID los frutos se consideraron no comercializables.

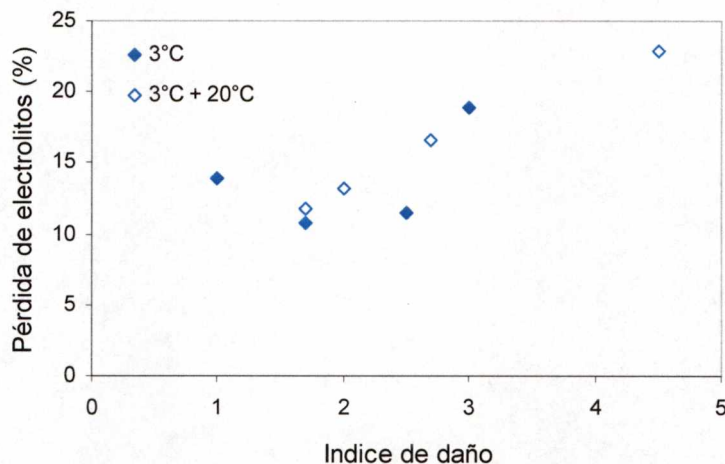


Figura 1.6. Relación entre la pérdida de electrolitos y el ID de berenjenas Black nite almacenadas a 3°C y frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 3,95$.

Las diferencias en el comportamiento de las tendencias de la pérdida de electrolitos encontradas en diferentes tejidos, llevaron a Côté y col. (1993), Saltveit (2002) y Bergevin y col. (1993) a confirmar la limitación del uso de este parámetro como medida indirecta del daño por frío.

I . 4.3. Pardeamiento de la pulpa

La pulpa de los frutos recién recolectados se caracterizó por tener una alta luminosidad ya que los valores correspondientes al parámetro L_0 fueron superiores a 75 indicando la preponderancia del blanco. Mollá y col. (1990) encontraron valores de L^* superiores a 70 en pulpa de berenjenas de las variedades Larga morada y Redonda negra lisa al cabo de 42 días de desarrollo de los frutos.

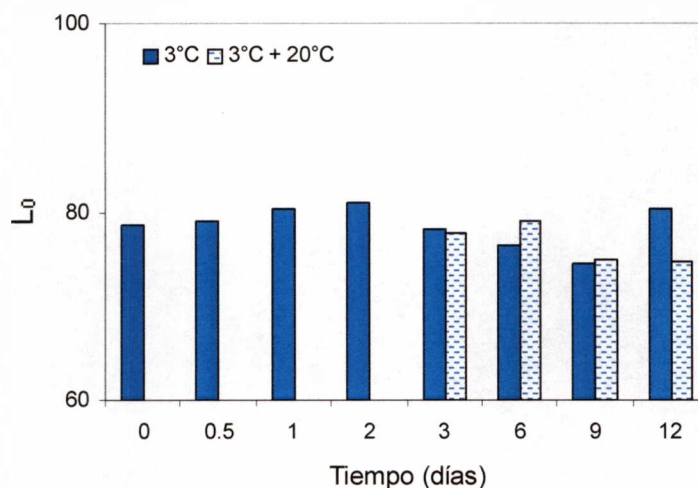


Figura I.7. Cambios del parámetro L_0 durante el almacenamiento de berenjenas Black nite a 3°C y frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 2,07$.

En la Figura I.7. se muestra la evolución de L_0 a lo largo del almacenamiento. Se observa que los valores de L_0 no registraron diferencias durante el tiempo de almacenamiento ni después del pasaje a 20°C. El nivel de daño moderado alcanzados por los frutos a los 12 días de almacenamiento se

corresponde con un ligero pardeamiento interno de la pulpa. Este es sólo uno de los síntomas ponderado en la evaluación de ID.

Sin embargo, Concellón (2003) encontró que para berenjenas Monkey Market N° 2 conservadas a 0° y 5°C, el valor de L_0 fue disminuyendo con el avance del tiempo de almacenamiento siendo más pronunciado este efecto a 0°C que a 5°C.

Asimismo, se registró una disminución de L^* en raíces de jicama durante su almacenamiento a una temperatura de 10°C que provoca daño por frío (Cantwell y col., 2002).

I . 4.4. Potencial de oxidación

Larrigaudiere y col. (1998), trabajando con peras, encontraron una correspondencia entre el pardeamiento del tejido y la disminución de ΔL (potencial de oxidación).

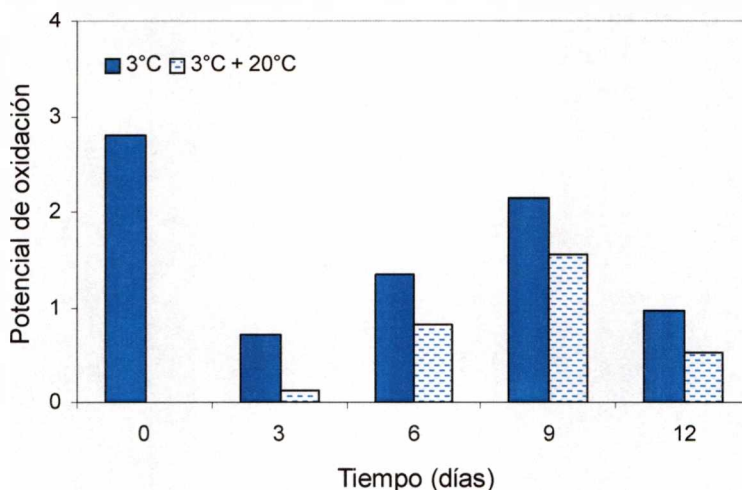


Figura I.8. Evolución del potencial de oxidación (ΔL_0) durante el almacenamiento de berenjenas Black nite a 3°C y frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 2,05$.

Los datos obtenidos presentaron una gran variabilidad adoptando valores en su mayoría positivos y algunos valores negativos (1 de 5). Así por

ejemplo, el valor inicial de ΔL fue, en promedio, 2,80 variando entre un mínimo de -0,05 y un máximo de 5,62 (-0,05 fue el único valor negativo registrado).

Como las diferencias de L^* son positivas cuando el tejido se oscurece, en la mayoría de los casos se registró oscurecimiento del tejido luego de 30 min de exposición al aire.

Sin embargo, si analizamos la variación ΔL en los ensayos realizados no se registraron diferencias significativas (Figura 1.8.) ni durante el almacenamiento a 3°C ni luego del pasaje a 20°C.

No obstante, Concellón (2003) observó una disminución de este parámetro en berenjenas cv. Money Maker N°2 almacenadas a temperaturas de daño por frío.

1.4.5. Color de la piel

El color característico de las berenjenas Black nite es púrpura oscuro. Este color característico se manifiesta desde el momento de la formación del fruto tal como puede observarse en la Figura 1.9. en la que se muestran berenjenas recolectadas luego de 3 días de la caída de los pétalos de las flores.

La medición objetiva del color de los frutos recién recolectados generó valores positivos de a^* (rojo) y negativos de b^* (azul) que variaron entre 3,40 - 6,31 y (-2,38) - (-1,42) respectivamente; el intervalo de variación de L^* fue 45,32 - 43,68 cercano al equilibrio entre blanco y negro.

Mediciones del color durante el desarrollo de berenjenas de las variedades Larga morada y Redonda negra lisa presentaron valores menores de L^* (12,11 y 9,64 respectivamente), mayores de a^* (7,8 y 8,08 respectivamente) y valores positivos de b para ambos cultivares a los 42 días de desarrollo de los frutos, fecha recomendada como óptima para su recolección (Mollá y col., 1990).

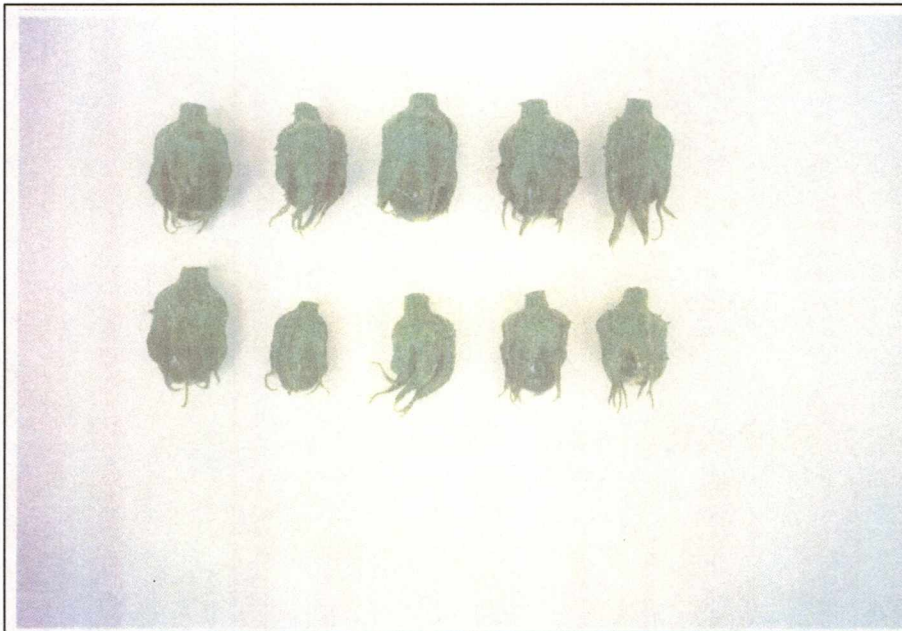


Figura 1.9. Aspecto de berenjenas Blake nite recolectadas a los 3 días de caída de los pétalos de las flores.

En la Figura 1.10. pueden verse los valores obtenidos de estos parámetros a lo largo del almacenamiento refrigerado. El valor de L^* mostró un incremento (17%) luego de 1 día de almacenamiento a 3°C para disminuir, a partir del tercer día, a niveles similares al inicial permaneciendo sin modificaciones hasta el final del período de conservación. El pasaje a 20°C no registró diferencia significativa en los valores de L^* .

Por su parte, el valor de a^* no manifestó diferencias significativas tanto durante el almacenamiento refrigerado como luego de pasaje. Sin embargo, el valor de b^* se mantuvo prácticamente constante hasta el día 2 aumentando aproximadamente 1,4 veces a partir del tercer día continuando lentamente con esta tendencia hasta el final del almacenamiento. No se evidenció diferencia significativa con los valores obtenidos para los frutos que sufrieron el pasaje a 20°C .

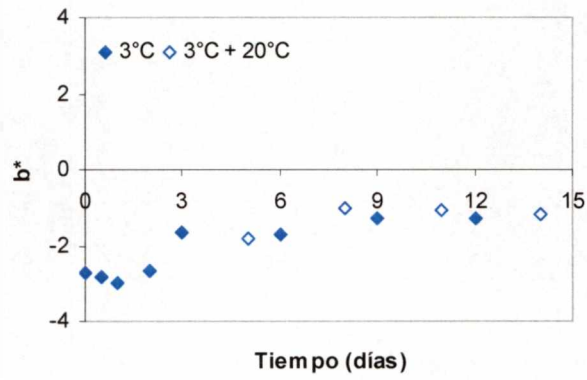
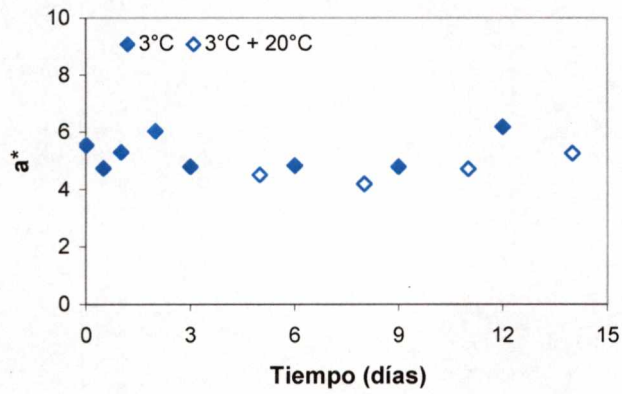
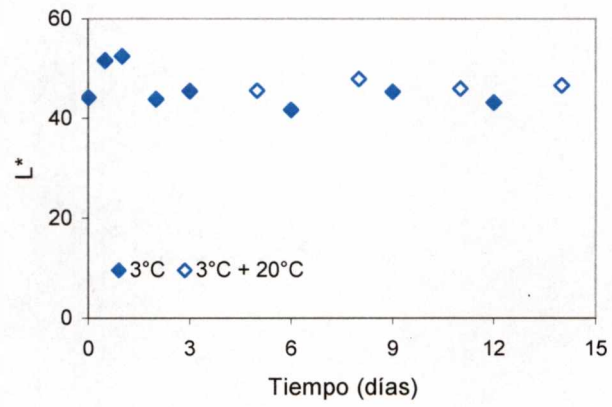


Figura I.10. Variación de las coordenadas de color a^* , b^* y L^* de berenjenas Black nite durante el almacenamiento a 3°C y luego del pasaje a 20°C por 48 h. $\text{LSD}_{0,05} (L^*) = 1,27$; $\text{LSD}_{0,05} (a^*) = 1,10$; $\text{LSD}_{0,05} (b^*) = 0,41$.

Asimismo, el parámetro Croma (Cr) mostró una marcada disminución a los 3 días tanto en los frutos refrigerados como en los frutos transferidos a 20°C por 48 h, tal como puede apreciarse en la Figura I.11, aumentando nuevamente al final del almacenamiento. Sin embargo, el valor de Hue aumentó en los primeros días de almacenamiento permaneciendo relativamente constante ($p>0.05$) hasta el final de la conservación.

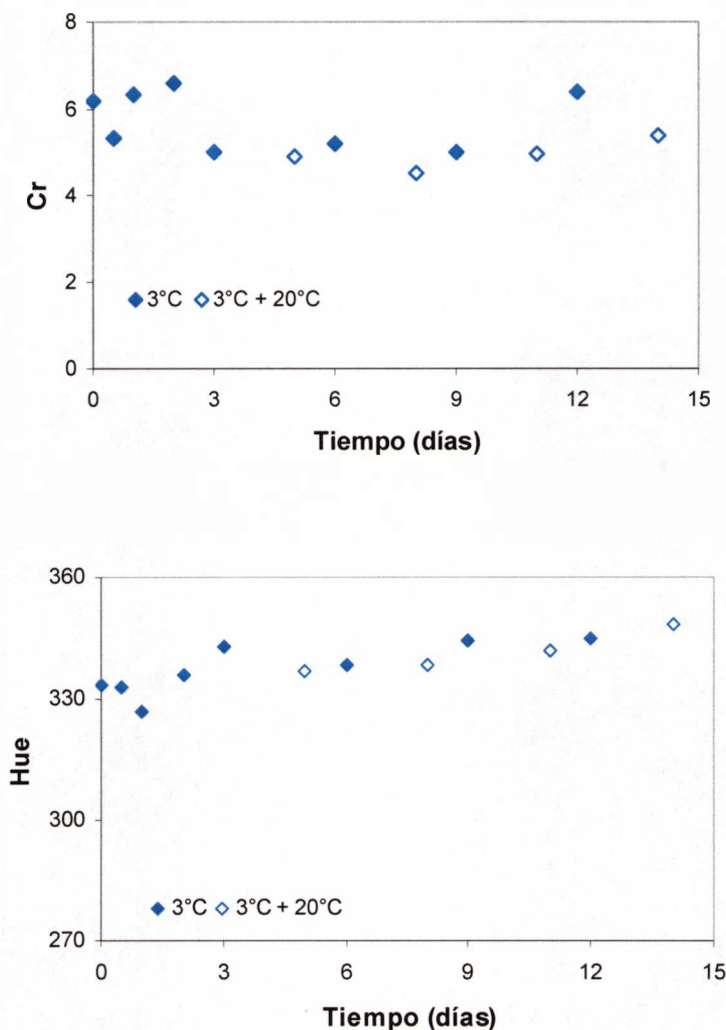


Figura I.11. Variación de los parámetros Cr y Hue de berenjenas Black nite durante el almacenamiento a 3°C y luego del pasaje a 20°C por 48 h. $LSD_{0,05}$ (Cr) = 1,06; $LSD_{0,05}$ (Hue) = 4,93

En productos tolerantes al daño por frío se encontraron resultados disímiles con respecto al comportamiento del color durante el almacenamiento

refrigerado. Así, en frutillas cv Chandler almacenadas a 0°, 5° y 10°C no se encontraron diferencias significativa en el color de la piel entre las temperaturas de almacenamiento pero sí en el tiempo (Ayala-Zavala y col., 2004). Sin embargo, en uvas de mesa cv Napoleón almacenadas en polipropileno perforado por 38 días a 0°C seguido de un pasaje por 6 días a 15°C en aire, no se observaron diferencias significativas en el tiempo para los parámetros de color L*, Cr y Hue (Artés-Hernández y col., 2003).

En el caso de berenjenas cv Money Maker N°2 almacenadas en bolsas perforadas de polietileno de baja densidad a 0°, 5° y 10°C durante 15 días no se registró grandes variaciones de color en la zona del centro de los frutos (Concellón, 2003).

Se realizaron, además, determinaciones de los parámetros de color en las manchas producidas por el daño por frío cuando el tamaño de las mismas permitió su medición. Los valores de L* y Cr no presentaron diferencias con los obtenidos para la piel pero sí lo hizo el Hue siendo menor el de la piel que el de las manchas. Esta diferencia se debió a valores menos negativos de b* disminuyendo la incidencia del color azul en las manchas cuya coloración tiende al marrón (datos no mostrados).

I . 5. CONCLUSIONES

- En berenjenas Black nite se observó daño por frío a partir del tercer día de almacenamiento a 3°C. Los síntomas de daño fueron incrementándose con el tiempo de almacenamiento a 3°C y se acentuaron con el pasaje de los frutos a 20°C.
- Los síntomas de daño por frío fueron punteado superficial, aparición de zonas punteadas, decoloración del cáliz, pardeamiento de semillas y pulpa.
- La pérdida de electrolitos fue significativa una vez que los frutos alcanzaron un determinado nivel de daño siendo esta medida indirecta del daño sensible para berenjenas con daño severo o muy severo.
- Tanto el almacenamiento como la transferencia de los frutos a 20°C evidenciaron valores de pérdida de electrolitos mayores que a 3°C.
- No se registraron diferencias significativas en el pardeamiento de la pulpa y en el potencial de oxidación de los frutos durante el tiempo de conservación estudiado.
- El parámetro Cr de la piel disminuyó a los 3 días de conservación y se registró un incremento de la luminosidad y el Hue de los frutos almacenados a 3°C a tiempos cortos.
- Las manchas de daño por frío se distinguieron por valores de Hue mayores que la piel debido a su coloración marrón característica.

CAPÍTULO II

VARIACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y DE LA ACTIVIDAD ANTIRADICAL

II . 1. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o disminuyen la oxidación inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones oxidativas en cadena (Bergman y col., 2001). Determinados tipos de estrés abiótico inducen la producción de antioxidantes en vegetales para contrarrestar el incremento de radicales libres (Bartosz, 1997; Starzyriska y col., 2003) producidos por el mismo.

Los principales compuestos antioxidantes presente en frutas y hortalizas son ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides y otros fenoles (Roberts y Gordon, 2003).

II . 1.1. Compuestos fenólicos

Los flavonoides y ácidos fenólicos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, incluyen un amplio grupo de compuestos naturales. El reciente interés en estos compuestos bioactivos se ha visto estimulado por los beneficios potenciales para la salud debido a sus roles como antioxidantes. (Awad y Jager, 2003).

Se realizaron numerosos estudios sobre las funciones de estos compuestos ya que poseen propiedades biológicas y químicas en común: carácter reductor, capacidad de secuestrar especies reactivas del oxígeno (ROS) y quelar iones metálicos, tendencia a la auto-oxidación y capacidad por regular la actividad de algunas enzimas celulares (Robards y col., 1999). Así, por ejemplo, Benkeblia (2000) encontró que las antocianinas y flavonoides presentes en cebolla podrían estar involucrados en la respuesta de los tejidos al estrés por frío.

Asimismo, los cambios de color que ocurren durante el desarrollo del daño por frío en frutas y vegetales están generalmente asociados con el metabolismo de compuestos fenólicos (Saltveit y Morris, 1990).

En manzanas, la concentración de flavonoides y ácido clorogénico generalmente disminuye durante el desarrollo del fruto hasta alcanzar un nivel

bajo, más o menos estacionario, durante la maduración. Sin embargo, los patrones de los cambios en fenoles durante el almacenamiento y la vida útil son variables (Awad y Jager, 2003).

II . 1.2. Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano (Figura II.1), los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos (Cartaya y Reynaldo, 2001).

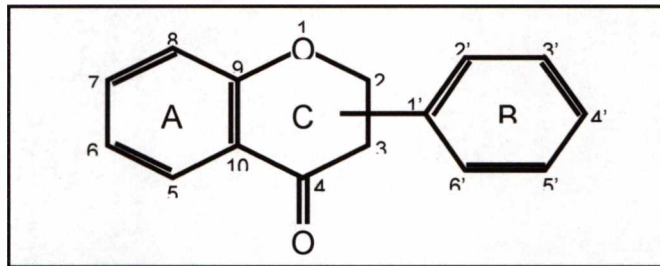


Figura II.1. Estructura básica del esqueleto flavonólico (Extraído de Cartaya y Reynaldo, 2001).

Entre éstos se encuentran, principalmente, los siguientes:

- a) Flavonas y flavonoles: son los más comunes y están ampliamente distribuidos en todos los pigmentos amarillos de las plantas.
- b) Flavononas y flavanonoles: existen en pequeñas cantidades comparados con los otros flavonoides. Son incoloros o sólo ligeramente amarillos.
- c) Antocianinas: siempre se encuentran en forma de glicósidos y son el grupo de pigmentos, después de la clorofila, más

importante en las plantas proporcionando el color rojo, violeta o azul, según su estructura, a numerosas flores y frutos.

Las diferencias individuales entre cada grupo se deben a la variación en el número y arreglo de los grupos hidroxilos así como a la naturaleza y extensión de la alquilación y/o glicosilación de estos grupos (Rice-Evans y col., 1996).

Las flavonas y flavonoles más comunes son los dihidroxilados en las posiciones 3' y 4' del anillo B. El sitio de glicosilación preponderante es la posición 3 y menos frecuentemente la posición 7 (Rice-Evans y col., 1996).

El azúcar que generalmente está presente en los flavonoides es la glucosa, aunque también se pueden encontrar galactosa, ramnosa y xilosa y el disacárido rutinosa.

Los flavonoides se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos (Cartaya y Reynaldo, 2001) y juegan roles diferentes en la ecología de los vegetales. Debido a sus colores atractivos, las flavonas, flavonoles y antocianinas actúan como señales visuales para los insectos polinizantes (Pietta, 2000). Debido a su astringencia, las catequinas y otros flavonoles pueden representar un sistema de defensa contra insectos perjudiciales para el vegetal (Mazza y Miniati, 1993). Los flavonoides actúan como catalizadores en la fase luminosa de la fotosíntesis y/o como reguladores de los canales de hierro involucrados en la fosforilación (Pietta y Simonetti, 1999). También, debido a sus propiedades de absorción de UV, los flavonoides protegen a los vegetales de dicha radiación solar y eliminan especies oxígeno reactivas generadas por UV (Ingram y col., 1997). Asimismo, actúan como protectores contra el estrés en células vegetales eliminando especies oxígeno reactivas producidas por el sistema fotosintético de transporte de electrones (Harborne, 1994).

II . 1.3. Actividad antiradical.

Los antioxidantes fenólicos forman una clase importante de compuestos que sirven para inhibir la oxidación de productos tanto de importancia comercial como biológica (Wright y col., 2001). La actividad antioxidante de los fenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, dadores de hidrógeno y secuestrantes de oxígeno singlete (Pyo y col., 2004).

La función de los antioxidantes es interceptar o reaccionar con radicales libres a una mayor velocidad que el sustrato existiendo dos caminos para la oxidación en los que los antioxidantes juegan un rol preventivo (Wright y col., 2001) como se describe a continuación:

El primero es la transferencia de un átomo de hidrógeno, importante en el mecanismo de oxidación de lípidos que se ilustra seguidamente:

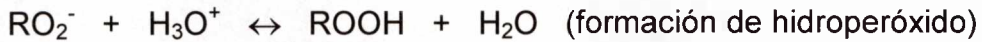
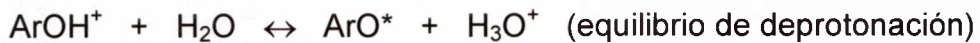


Una vez generado el radical libre R^* , las reacciones (2) y (3) forman una reacción en cadena que, en el caso de los lípidos, convergen en hidroperóxidos lipídicos (ROOH). El papel de los antioxidantes (ArOH) es interrumpir la reacción en cadena de acuerdo a la siguiente ecuación:



Para ser efectivo, ArO^* debe ser un radical libre relativamente estable que reacciona lentamente con el sustrato RH y rápidamente con RO_2^* .

El otro mecanismo posible por el cual un antioxidante puede desactivar un radical libre es la transferencia electrónica, en la cual se forma primero el catión seguido de una deprotonación rápida y reversible en solución, de acuerdo a las siguientes reacciones:



El resultado neto de las ecuaciones anteriores resulta en la misma ecuación (4).

Por lo tanto, el efecto antioxidante global de los flavonoides sobre la peroxidación lipídica está relacionado con sus propiedades secuestrantes de $\cdot\text{OH}$ y O_2^- y su reacción con radicales peroxy (Husain y col., 1987).

Los factores de estrés que influyen en los tejidos vegetales causan el incremento de radicales libres de oxígeno en las células, dando lugar al estrés oxidativo (Bartosz, 1997). Si la actividad del sistema antioxidante en las células vegetales no es lo suficientemente alto, se produce la senescencia intensa del tejido (Hodges y col., 2001). Este mecanismo constituye la base de los cambios fisiológicos que se producen en los tejidos vegetales almacenados, determinando su durabilidad postcosecha. Además de las enzimas, los antioxidantes no enzimáticos como los fenoles y flavonoides constituyen agentes importantes de defensa de los vegetales contra estos radicales libres (Starzyriska y col., 2003).

Los alimentos cotidianos tienen una amplia variedad de moléculas que reaccionan con radicales libres; así, frutas, vegetales, té, vino, etc. son productos ricos en compuestos antioxidantes tales como flavonoides, antocianinas, carotenoides y vitaminas (Soler-Rivas y col., 2000)

Actualmente se presta especial atención al metabolismo postcosecha de estas sustancias. Además, según reportes recientes, se encontró una correlación altamente positiva entre los fenoles totales y la actividad antioxidante en muchas especies vegetales (Leja y col., 2001).

Por otra parte, los antioxidantes de las frutas protegen los tejidos no sólo contra situaciones de estrés sino también contra enfermedades. La resistencia postcosecha a enfermedades puede también ser inducida por moléculas antifúngicas específicas, por ejemplo, compuestos fenólicos tales como fitoalexinas y proantocianidinas (Ayala-Zavala y col., 2004).

Como el almacenamiento postcosecha puede afectar el nivel de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de frutas y vegetales, el contenido de antioxidantes se ha transformado en un parámetro cada vez más importante con respecto a la calidad de frutas y vegetales destacándose el interés por evaluar los cambios en su capacidad antioxidante durante el almacenamiento postcosecha de cultivos hortícolas (Ayala-Zavala y col., 2004).

Así, se ha estudiado la capacidad antioxidantes, por diferentes métodos, de muchos productos vegetales como brócoli, zanahorias, coliflor, uvas, cebollas, frutillas (Roberts y Gordon, 2003), espinacas (Bergman y col., 2001), mora (Zhishen y col., 1999) y hongos (Cheung y Cheung, 2005), entre otros.

II . 2. OBJETIVOS

II . 2.1. Objetivo general

Investigar la evolución de compuestos antioxidantes y su actividad en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C

II . 2.2. Objetivos específicos

- a) Evaluar la variación de los compuestos fenólicos en berenjenas Black nite almacenadas a 3°C y compararla con los valores correspondientes a frutos testigos almacenados a 20°C.
- b) Estudiar las modificaciones en la concentración de flavonoides durante el almacenamiento refrigerado de berenjenas Black nite.
- c) Determinar las modificaciones en el contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento a 3°C de berenjenas Black nite.
- d) Analizar el efecto del estrés por bajas temperaturas en la actividad antiradical de berenjenas Black nite.

II . 3. MATERIALES Y MÉTODOS

II . 3.1. Material vegetal

Se trabajó con berenjenas del cultivar Black nite provenientes de una finca ubicada en la localidad de La Dársena del Departamento Banda, Provincia de Santiago del Estero, Argentina.

Los frutos se cosecharon manualmente, en horas tempranas de la mañana, con grado de madurez comercial correspondiente a un peso de 300 – 400 g. Las berenjenas se seleccionaron según forma, tamaño y ausencia de defectos. Una vez en el laboratorio, los frutos se lavaron con agua clorada, se escurrieron y se dejaron secar.

II . 3.2. Almacenamiento

Los frutos se envasaron individualmente en bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) perforadas (190 perforaciones/m² de 13 mm de diámetro) para permitir un buen intercambio gaseoso. Posteriormente se conservaron a 3°C durante 12 a 17 días, usándose como testigo frutos almacenados a 20°C.

Periódicamente (cada 12-24 h hasta los 3 días y, posteriormente, cada 3 días) se extrajeron muestras compuestas de cinco frutos cada una. Para tiempos de almacenamiento igual y superiores a los 3 días, una muestra de las berenjenas que permaneció a 3°C, fue transferida a 20°C durante 48 horas para simular condiciones de venta.

II . 3.3. Determinaciones

II . 3.3.1. Fenoles

Se determinaron los polifenoles a través de la evaluación global de los mismos por el método de Folin-Ciocalteu utilizando la metodología descrita por Swain y Hillis (1959).

a.- Preparación de las muestras

La muestra para análisis se preparó cortando una rodaja de 2 cm de espesor de la zona ecuatorial de cada fruto muestreado para cada tiempo y ensayo. Las rodajas se dividieron en cuatro porciones tomándose dos de los extremos opuestos a los que se les retiró la piel. Posteriormente las muestras se congelaron, perfectamente acondicionadas en papel de aluminio y film auto adherente, hasta el momento de su análisis. La submuestra para el análisis se obtuvo dividiendo cada uno de los cuartos por la mitad.

b.- Extracción

Se homogeneizó el tejido vegetal en una procesadora de uso doméstico para lo cual se pesó aproximadamente 10 g del mismo en un erlenmeyer mezclándose con 40 ml de alcohol etílico 96°.

Luego se realizó la extracción a reflujo durante 1 hora y a temperatura de ebullición. Posteriormente, el extracto alcohólico obtenido se dejó enfriar, se filtró bajo vacío y se llevó a 50 ml con alcohol etílico.

Las soluciones se guardaron en frascos de color caramelo a -18°C hasta su cuantificación.

c.- Curva de calibración

Se realizó utilizando una solución de catequina al 0,05% como estándar. En tubos de ensayo y por duplicado, se prepararon las diluciones de la solución patrón mediante la adición de agua destilada, en cantidad suficiente para completar 1800 μl , a 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μl de la solución de catequina. Se agregó 400 μl del reactivo de Lowry, se agitó en Vortex y se dejó reposar durante 10 minutos.

El reactivo de Lowry se preparó mezclando 50 ml de solución de Na_2CO_3 2 % en NaOH 0,1 N (Solución A) con 1 ml de solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1% - Tartrato de Na y K 2% (1:1) (Solución B).

A continuación, se agregaron 200 μ l del reactivo de Folin–Ciocalteu (diluido 1:1 en agua destilada) agitándose nuevamente en Vortex y se dejó reposar por 30 minutos.

Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UNICAM UV2 y se regresionaron los datos a fin de obtener la ecuación correspondiente de la curva de calibración.

d.- Cuantificación

En sendos tubos de ensayo se mezclaron 200-300 μ l del extracto alcohólico vegetal con cantidad suficiente de agua destilada para completar 1800 μ l. Posteriormente se hizo reaccionar la mezcla con los reactivos de Lowry y Folin–Ciocalteu tal como se describió en el apartado anterior.

Se leyó la absorbancia a 760 nm y se calculó, con la curva de calibración obtenida, la cantidad de compuestos fenólicos del extracto.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en mg de catequina equivalente / 100 g de tejido vegetal fresco.

II . 3.3.2. Flavonoides

Se utilizó la técnica descrita por Zhishen y col. (1999) con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

a.- Extracto vegetal

Se utilizó el mismo extracto obtenido para la cuantificación de fenoles.

b.- Curva de calibración

Se realizó utilizando una solución patrón de catequina para cuya preparación se pesaron 10 mg, se disolvieron en agua destilada y se llevó a 100 ml.

Posteriormente se prepararon, en tubos de ensayo y por duplicado, las diluciones de la solución patrón mediante la adición de agua destilada, en cantidad suficiente para completar 3 ml, a 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 μl de la solución de catequina. A tiempo cero ($t = 0$) se agregaron 300 μl de NaNO_2 al 5%. Luego de 5 min se añadieron 300 μl de AlCl_3 al 10% y al cabo de 6 min se adicionaron 2 ml de NaOH 1 M. Inmediatamente se agregó cantidad suficiente de agua destilada para completar 5 ml y se agitó en Vortex.

Se midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro HITACHI y se ajustaron los datos a fin de obtener la ecuación correspondiente de la curva de calibración.

c.- Cuantificación

En sendos tubos de ensayo se mezclaron 0,6-1 ml del extracto alcohólico con cantidad suficiente de agua destilada para completar 3 ml. Posteriormente se hizo reaccionar la mezcla con los reactivos tal como se describió anteriormente.

Se leyó la absorbancia a 510 nm y se calculó, con la curva de calibración obtenida, la cantidad de flavonoides del extracto.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en mg de catequina equivalente / 100 g de tejido vegetal fresco.

II . 3.3.3. Ácido ascórbico

Su determinación se realizó utilizando 2,6-diclorofenolindofenol según la metodología descrita por la Association of Official Analytical Chemists (1975).

a.- Preparación de las muestras

La muestra para análisis se preparó cortando una rodaja de 2 cm de espesor de la zona ecuatorial de cada fruto muestreado para cada tiempo y ensayo. Las rodajas se dividieron en cuatro porciones tomándose dos de los

extremos opuestos a los que se les retiró la piel. La submuestra para el análisis se obtuvo dividiendo por la mitad cada uno de los cuartos obtenidos.

b.- Preparación del extracto y cuantificación

Se homogeneizaron 10-20 g de tejido vegetal en una procesadora de uso doméstico con 30 ml de buffer.

El buffer se preparó disolviendo 30 g de ácido metafosfórico en 80 ml de ácido acético que se diluyeron con agua destilada hasta completar 1 litro. Esta solución se preparó semanalmente debido a la hidrólisis del ácido metafosfórico.

El homogeneizado obtenido se filtró y se tituló 15 ml del filtrado con solución de autoindicador 2,6 diclorofenolindofenol al 0,025% hasta la aparición de color rosado.

Para obtener el título del autoindicador, se tituló con una solución patrón recién preparada de ácido ascórbico al 0,1% en buffer metafosfórico-acético.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en mg de ácido ascórbico / 100 g de tejido vegetal fresco.

II . 3.3.4. Actividad antiradical

La técnica empleada fue la descrita por Brand-Williams y col. (1995) utilizándose como radical estable el 2,2-difenil-1-picrilhidrazol (DPPH*) en solución metanólica.

a.- Preparación de las muestras

La muestra se preparó tal como se describió para la determinación de fenoles y los análisis se efectuaron inmediatamente después de finalizado el ensayo de almacenamiento.

b.- Extracción

Se homogeneizaron 10 g de tejido vegetal en una procesadora de uso doméstico con 30 ml de MeOH. Se filtró el homogeneizado obtenido llevándose nuevamente el filtrado a 30 ml mediante la adición de cantidad suficiente de MeOH.

c.- Cinética de la reacción

En una cubeta se agregó 60 μ l de extracto con cantidad suficiente de solución metanólica de 2,2-Difenil-1-picrilhidrazol (DPPH*) de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/l. Se determinó la disminución de la absorbancia a 515 nm cada minuto desde el tiempo 0 min hasta los 20 min y posteriormente cada 5 min a fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el plató de la reacción. Las mediciones se efectuaron con un espectrofotómetro UV- Visible CAM SPEC M330.

d.- Cuantificación

Para determinar la actividad antiradical (actividad antioxidante) de la muestra, se colocaron volúmenes variables del extracto en una cubeta con solución metanólica de DPPH* hasta completar los 3 ml. Se leyó la absorbancia antes del agregado del extracto (A_0) y al cabo del tiempo determinado anteriormente como el necesario para alcanzar el plató (A_∞). Se graficó el % (A_∞ / A_0) en función del volumen de extracto añadido, regresionándose los datos a fin de obtener el volumen de extracto necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH* en un 50% (concentración eficiente = EC_{50}).

Las determinaciones se efectuaron por duplicado midiéndose su absorbancia en un espectrofotómetro UV- Visible CAM SPEC M330.

Los resultados se expresan como $1/EC_{50}$ o poder antiradical.

II . 3.3.5. Análisis estadístico

Las experiencias se realizaron según un diseño factorial llevándose a cabo por lo menos cuatro ensayos. Los factores analizados fueron temperatura y tiempo de almacenamiento.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA) de los resultados comparándose las medias con el test LSD para un nivel de significancia (α) igual a 0,05 utilizándose el software estadístico SPSS 10.0.

II . 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II . 4.1. Fenoles

Muchos tejidos vegetales responden al estrés ambiental con cambios en el metabolismo de compuestos fenólicos. Así, la exposición de ciertos tejidos a temperaturas bajas estimula el metabolismo de estos compuestos (Rhodes y col., 1981).

La Figura II.2. muestra la evolución en el contenido de fenoles totales de los frutos almacenados a 3°C y luego del pasaje a 20°C

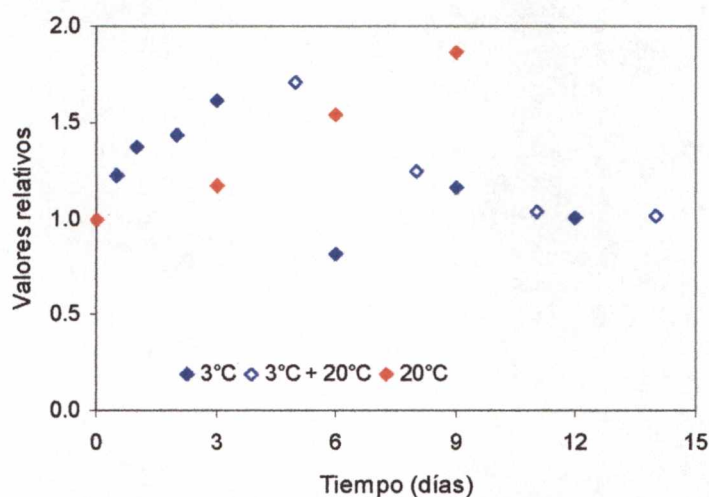


Figura II.2. Evolución del contenido de fenoles, en valores relativos al inicial, de berenjenas Black Nite durante el almacenamiento a 3°C, 20°C y almacenadas a 3°C y transferidas a 20°C por 48 h. $LSD_{0,05} = 0,03$.

En ésta se observa que dicho contenido se incrementa ya al cabo de 0,5 días de almacenamiento, manteniendo esta tendencia hasta el tercer día en el que alcanza un valor 1,6 veces mayor que el inicial. En este tiempo de almacenamiento los frutos mostraron las primeras manifestaciones del daño por frío (incipiente) con un índice de daño próximo a 2. Posteriormente, a los 6

días de almacenamiento se registra una disminución en el contenido de fenoles tendencia que continúa hasta 12 días de conservación.

Las muestras transferidas a 20°C arrojaron valores superiores a las almacenadas a 3°C tanto a los 3 días como a los 6 días de almacenamiento. A los 9 días, el pasaje ocasionó una ligera disminución en el contenido de fenoles no encontrándose diferencias significativas al final del período de conservación.

López-Andréu y col. (1988) también comprobaron el aumento de fenoles durante los primeros días de almacenamiento a 5°C en berenjenas cv. Redonda Negra Lisa seguido de una disminución al cabo de los 18 días. Observaron, también, tendencias similares en los frutos almacenados a 10° y 20°C siendo más acusadas las pérdidas a esta última temperatura.

Sin embargo, estudios realizados con berenjenas cv. Hyonaga mostraron una disminución a menos de la mitad del valor inicial de ácido clorogénico luego de 2 días de almacenamiento a 1°C seguido de un rápido aumento para disminuir, nuevamente, a los 10 días de conservación (Kozukue y col., 1979). Estos autores también analizaron el comportamiento del contenido de este ácido en frutos transferidos a 20°C observando un incremento de 2,5 veces en el mismo ya a las 10 horas de efectuada la transferencia de frutos almacenados durante 2 días; no obstante, no registraron incrementos en las frutas almacenadas a 1°C por 4, 7 y 10 días.

El incremento marcado en la concentración de fenoles totales durante el almacenamiento refrigerado se observó también en otros productos que sufren daño por frío. Así, Rhodes y col. (1981) encontraron un continuo incremento en el contenido de ácido clorogénico en papas hasta los 50 días de almacenamiento a 0°C seguido de una tendencia a disminuir. Un comportamiento similar se registró cuando se almacenaron papas a 2°C desplazándose el pico a los 75 días.

Igualmente, en raíces de jicama almacenadas a 10°C (temperatura de daño), la concentración de fenoles aumentó luego de 14 días de almacenamiento, mientras que a 13°C dichas concentraciones permanecieron en los niveles iniciales. La transferencia a 20°C ocasionó un gran incremento

del contenido de fenoles de las raíces almacenadas a 10°C y pocos cambios en las almacenadas a 13°C (Cantwell y col., 2002).

Por otra parte, en vegetales que no sufren daño por frío también se encontraron incrementos en los contenidos de compuestos fenólicos totales. En frutillas cv. Chandler almacenadas a 5° y 10°C se registró un aumento continuo de los mismos aunque las frutas almacenadas a 0°C mantuvieron un nivel constante durante el período de almacenamiento (13 días) (Ayala-Zavala y col., 2004). Asimismo, comportamientos similares se observaron en lechuga (Leja y col., 1994), en piel de manzanas (Pérez-Ilzalbe y col., 1997) y brócoli (Starzyriska y col., 2003), entre otros.

Durante el almacenamiento de los frutos testigos, el contenido de fenoles, que también se representa en la Figura II.2., registró un incremento creciente hasta el final de su conservación. Sin embargo, los contenidos alcanzados en los primeros días a 20°C fueron menores que los correspondientes a 3°C.

Un aumento gradual también fue registrado por Kozukue y col., (1979) durante el almacenamiento a 20°C de berenjenas cv. Hyonaga a través del incremento en el contenido de ácido clorogénico.

Del mismo modo, se observaron incrementos en brócoli almacenado a 20°C (Starzyriska y col., 2003; Leja y col., 2001) y cebollas (Berkeblia, 2000), productos no susceptibles al daño por frío.

Dado el comportamiento similar observado en productos sensible y no sensibles al daño por frío, el incremento en la síntesis de compuestos fenólicos ratifica este mecanismo como instrumento de defensa de los vegetales ante situaciones de estrés por bajas temperaturas y senescencia.

II . 4.2. Flavonoides

A fin de evaluar la incidencia de la participación de los flavonoides en la concentración total de compuestos fenólicos se siguió su evolución a lo largo del período de almacenamiento.

Así, en la Figura II.3. se muestra el comportamiento de estos compuestos en los frutos almacenados a 3°C y luego del pasaje a 20°C.

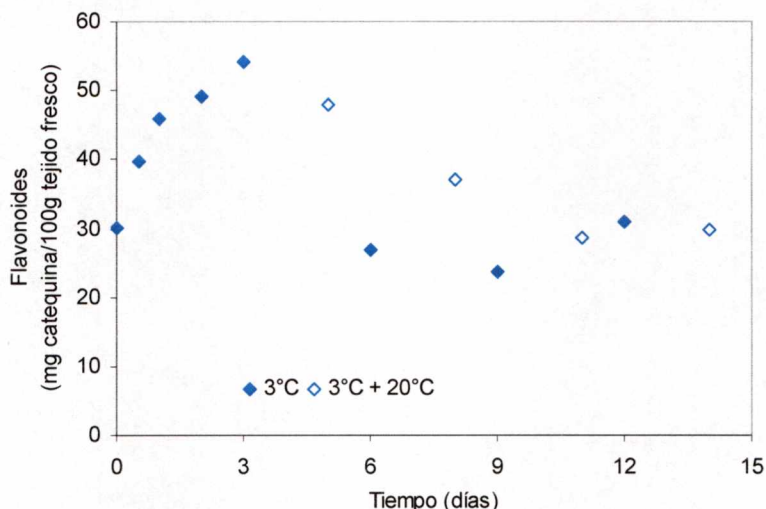


Figura II.3. Evolución del contenido de flavonoides de berenjenas Black Nite durante el almacenamiento a 3°C y almacenadas a 3°C y transferidas a 20°C por 48 h. $LSD_{0,05} = 1,37$.

Las modificaciones experimentadas en dicho contenido siguen un patrón similar al de los compuestos fenólicos totales registrándose un marcado incremento hasta el 3° día de conservación a 3°C. Asimismo, también se observa que las muestras transferidas a 20°C arrojaron valores inferiores de flavonoides al cabo de 3 días de almacenamiento. A los 6 y 9 días dicho contenido fue significativamente mayor no encontrándose diferencias al final del periodo de conservación. Comparando este comportamiento con el verificado para fenoles totales, existen tendencias diferentes sólo en las muestras de 3 y 9 días de conservación en frío.

El porcentaje de aporte de los flavonoides a los fenoles totales fue superior al 85% en los frutos recién recolectados, proporción que fue incrementándose hasta el segundo día de almacenamiento seguido luego por una lenta disminución tal como puede apreciarse en la Figura II.4.

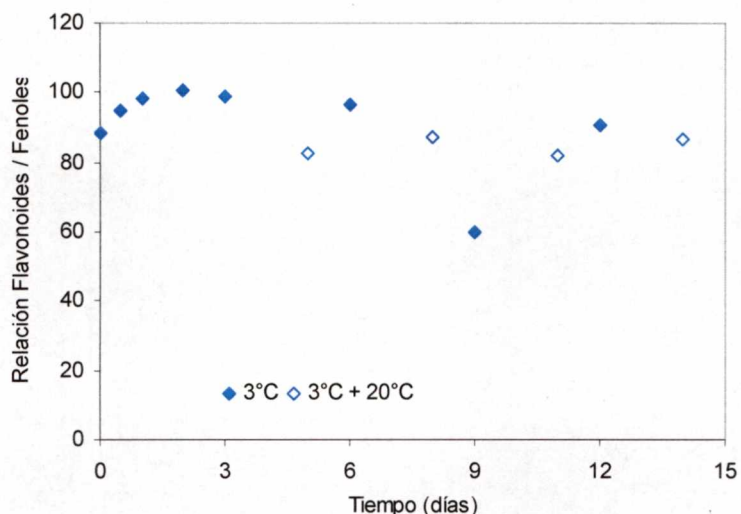


Figura II.4. Variación del aporte del contenido de flavonoides a los compuestos fenólicos totales de berenjenas Black Nite durante el almacenamiento a 3°C y almacenadas a 3°C y transferidas a 20°C por 48 h. $LSD_{0,05} = 3,77$.

Por otra parte, el porcentaje de flavonoides en el contenido global de fenoles es, en general, menor en las muestras transferidas a 20°C que en las muestras almacenadas a 3°C, presentando variaciones entre el 82 y el 87%.

II . 4.3. Ácido ascórbico

Los extractos para esta determinación se prepararon a partir de diferentes cantidades de tejido hallándose sólo trazas, que no pudieron cuantificarse.

López-Andréu y col. (1988) determinaron el contenido de ácido ascórbico en berenjenas de la variedad "Redonda Negra Lisa" y encontraron valores muy bajos de 3,92 mg/100 g. Asimismo, observaron que durante el almacenamiento de estos frutos a 10° y 20°C, se producía una disminución del 79% y 81% respectivamente, luego de 18 días de conservación. A 5°C la degradación fue mucho menor y las pérdidas llegaron al 60%. Resultados similares encontraron Esteban y col. (1989a) trabajando con la misma variedad.

En el caso de zucchini cv. Elite conservados a 5°C, también se percibió una disminución progresiva en el contenido de ácido ascórbico detectada ya a partir del segundo día de almacenamiento (Wang, 1996).

II . 4.4. Actividad antiradical

II . 4.4.1. Cinética de disminución del DPPH*

La Figura II.5 muestra la cinética de disminución del DPPH* obtenida a fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en la reacción.

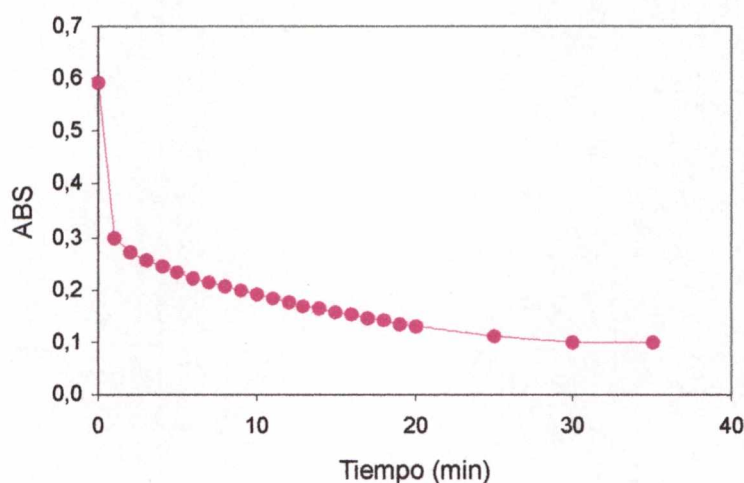


Figura II.5. Comportamiento cinético de los extractos de berenjenas al reaccionar con el DPPH*.

Como puede verse en la misma, al minuto de reacción se verificó una drástica caída en los valores de la absorbancia disminuyendo posteriormente de manera más lenta. Al cabo de los 35 minutos se alcanzó el plató correspondiente, por lo cual para la determinación de A_{x_0} de las muestras se leyó la absorbancia luego de 40 min de reacción.

II . 4.4.2. Evolución de la actividad antiradical durante el almacenamiento

En la Figura II.6. se muestran los valores relativos de $1/EC_{50}$ obtenidos para las diferentes muestras almacenadas. Cabe aclarar que mayores valores de $1/EC_{50}$ corresponde a mayor actividad o poder antiradical.

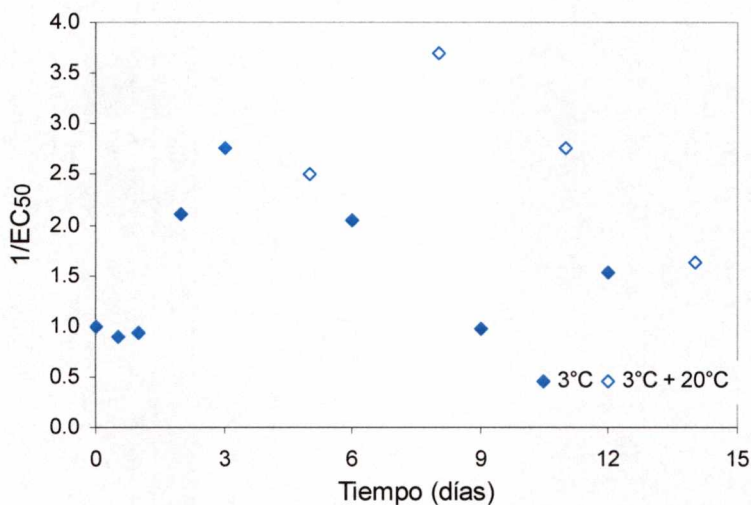


Figura II.6. Evolución de $1/EC_{50}$ de extractos de berenjenas almacenadas a 3°C y luego del pasaje a 20°C posterior al almacenamiento refrigerado. Los datos se expresan en unidades relativas al valor inicial. $LSD_{0,05} = 0,02$.

Tal como puede observarse en la misma, se registró una ligera disminución en la actividad antiradical de los extractos analizados durante las primeras horas del almacenamiento, para luego continuar con una tendencia similar a la observada en la evolución de flavonoides en las berenjenas almacenadas tanto a 3°C como después del pasaje a 20°C.

Por lo tanto, se encontró una mejor relación positiva entre el contenido de flavonoides y la actividad antiradical que entre el contenido de fenoles totales y ésta. Asimismo, Ayala-Zavala y col. (2004) determinaron que existía una correlación positiva entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales o antocianinas en frutillas.

Leja y col. (2001) observaron un marcado incremento en la capacidad antioxidante de floretes de brócoli cv. Lord durante su almacenamiento a 5°C

por siete días, siendo mayores los valores obtenidos durante el almacenamiento a 20°C. Asimismo, incrementos significativos en la capacidad antioxidante de frutillas cv. Chandler se encontraron durante el almacenamiento a 5°C y 10°C si bien se registraron cambios muy pequeños durante el almacenamiento a 0°C que podrían estar relacionados con los diferentes niveles de fenoles totales (Ayala-Zavala y col., 2004).

Puesto que, en nuestros ensayos, se encontró un marcado incremento en la concentración de fenoles totales y flavonoides durante los 3 primeros días de almacenamiento de los frutos sometidos a temperaturas de daño, este comportamiento indicaría una estimulación del sistema antioxidante del vegetal para contrarrestar el estrés provocado por el frío. Sin embargo, cabe resaltar que si la actividad antiradical no es lo suficientemente alta, el mismo se manifiesta.

II . 5. CONCLUSIONES

- Se registró un incremento en la concentración tanto de fenoles totales como de flavonoides durante los 3 primeros días de almacenamiento de berenjenas Black nite a 3°C.
- Los compuestos fenólicos de los frutos almacenados a 20°C mostraron un incremento positivo lineal con el tiempo de almacenamiento.
- Los flavonoides constituyen más del 85% de los fenoles totales de berenjenas Black nite.
- La actividad antiradical mostró una evolución similar a la de flavonoides durante el almacenamiento de las berenjenas tanto a 3°C y como luego del pasaje a 20°C.
- No se detectó ácido ascórbico en las berenjenas Black nite.

III . 1. INTRODUCCIÓN

Las lipoxigenasas (LOX: linoleato oxígeno oxidoreductasa, EC 1.13.11.12) son enzimas que catalizan la adición de oxígeno molecular a los ácidos grasos que contienen uno o más sistemas *cis,cis*-1,4-pentadieno para producir hidroperóxidos del ácido graso insaturado.

La oxidación de estos ácidos grasos poliinsaturados, catalizada por la mayoría de las lipoxigenasas, está caracterizada por una alta especificidad posicional. Así, los productos derivados del ácido linoleico generalmente contienen grupos hidroperóxidos en C-9 o C-13 (López-Nicolás y col., 2001), tal como se esquematiza en la Figura III.1.

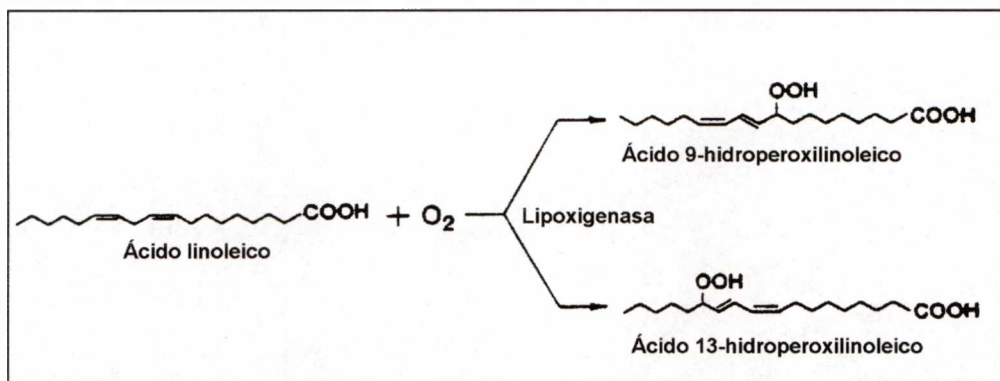


Figura III.1. Reacción primaria catalizada por la lipoxigenasa usando ácido linoleico (ácido *cis,cis*-9,12-octadecadienoico) como sustrato indicando los dos posibles productos de reacción, ácido 9- y 13-hidroperoxilinoico (Extraído de Siedow, 1991).

El producto hidroperoxidado resultante contiene un juego de dobles enlaces *cis, trans* que están ahora conjugados como resultado de la migración de un doble enlace durante el ciclo catalítico (Siedow, 1991).

Estas enzimas están ubicuamente distribuidas en animales y plantas y tienen una función clave en la formación de sustancias biológicamente activas (Siedow, 1991) tal como ácido jasmónico.

López-Nicolás y col. (2001) encontraron que LOX de berenjenas cv. Belleza negra mostraba una fuerte preferencia por el ácido linoleico siendo mucho menor su actividad frente al ácido linolénico (menos del 4% de la

obtenida para ácido linoleico). Asimismo no detectaron actividad, cuando la enzima era incubada con ácido araquidónico.

III . 1.1. Tipos de lipoxigenasas

Se han detectado múltiples isoformas de LOX en un amplia variedad de plantas, animales y microorganismos que se distinguen por los diferentes pH óptimos de reacción, pl, especificidad de sustrato y producto, localización subcelular y en tejidos específicos, y síntesis en estados particulares de desarrollo (Chen y col., 2004).

Así, por ejemplo, trabajos realizados con cotiledones de soja permitieron identificar 3 isozimas: lipoxigenasas-1,-2 y -3. Estas isozimas son proteínas globulares, solubles en agua, que consisten en un único polipéptido de peso molecular aproximado de 96 kDa. Difieren en su punto isoeléctrico que es 5,68, 6,25 y 6,15 para las lipoxigenasa-1, -2 y -3, respectivamente. (Siedow, 1991). Análisis efectuados con LOX purificadas provenientes de soja indicaron la presencia de un átomo de hierro por cada 96 kDa de proteína (Chan, 1973; Pistorius y col., 1974).

Las diferencias entre estas isozimas radican en sus reactividades. Así, las lipoxigenasas-1 poseen un pH óptimo alrededor de 9,0 y muestran una marcada preferencia por ácidos grasos cargados y poca reactividad con ácidos grasos esterificados. Por otra parte, las lipoxigenasas-2 y -3: poseen pH óptimos cercanos a 6,5 y 7, respectivamente; son más reactivas con ácidos grasos neutros pero pueden reaccionar con ácidos grasos libres sobre todo a pH por debajo de 7,0 (Siedow, 1991).

En el caso de berenjenas, Grossman y col. (1972) determinaron la existencia de dos fracciones de lipoxigenasa (A y B) capaces de oxidar al ácido linoleico, siendo más activa la fracción A.

Sin embargo, Nakayama y col. (1995) no diferenciaron isozimas en la caracterización de lipoxigenasa purificada de berenjenas cv. Naganasu. Determinaron que dicha enzima es monomérica con una masa molecular de 95 kDa, un punto isoeléctrico de 4,4 y que contenía 1,3 átomo-gramo de hierro no

hemínico por enzima. Su actividad específica y el valor de K_m para la oxigenación de linoleato fueron $7,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y $0,8 \text{ mM}$, respectivamente, a 25°C y pH 7.

III . 1.2. Rol fisiológico

Si bien el rol fisiológico de las lipoxigenasas vegetales está poco comprendido, sus productos son sustratos para la posterior acción de otras enzimas (López-Nicolás y col., 2001).

Es así que se han realizado numerosas investigaciones a fin de relacionar la actividad de esta enzima con el crecimiento y desarrollo vegetal, la biosíntesis de moléculas reguladoras, la senescencia, la respuesta de los vegetales a lesiones e infección de patógenos (Siedow, 1991) así como con la participación de sus productos en la síntesis de compuestos volátiles.

En ese sentido, se han reportado incrementos en la actividad de LOX inmediatamente después de la germinación y durante las primeras etapas de crecimiento de plantas jóvenes tales como arroz (Ohta y col., 1986), trigo (Guss y col., 1968), mostaza (Oelze-Karow y col., 1970), lupines (Beneytour y col., 1988) y pepinos (Matsui y col., 1988). En general parece existir una correlación entre la actividad de esta enzima en tejidos vegetales y la velocidad de elongación siendo mayor sus niveles en tejidos que crecen rápidamente (Siedow, 1991).

Por otra parte, existen dos rutas principales para metabolizar los hidroperóxidos producidos por acción de la lipoxigenasa sobre los ácidos grasos en las plantas superiores, tal como puede observarse en la Figura III.2.

El ácido jasmónico producto del metabolismo y su metil éster poseen funciones similares a las del ácido abscísico. Así, algunos de los efectos fisiológicos atribuidos al ácido jasmónico son la estimulación de la producción de etileno en frutas maduras, la inducción de proteínas específicas en la senescencia de hojas y una inhibición general del crecimiento en plantas jóvenes de arroz (Vick y Zimmerman, 1984). Por otra parte, también se ha

demostrado que la aplicación de metil jasmonatos parece incrementar la tolerancia al daño por frío de diferentes productos.

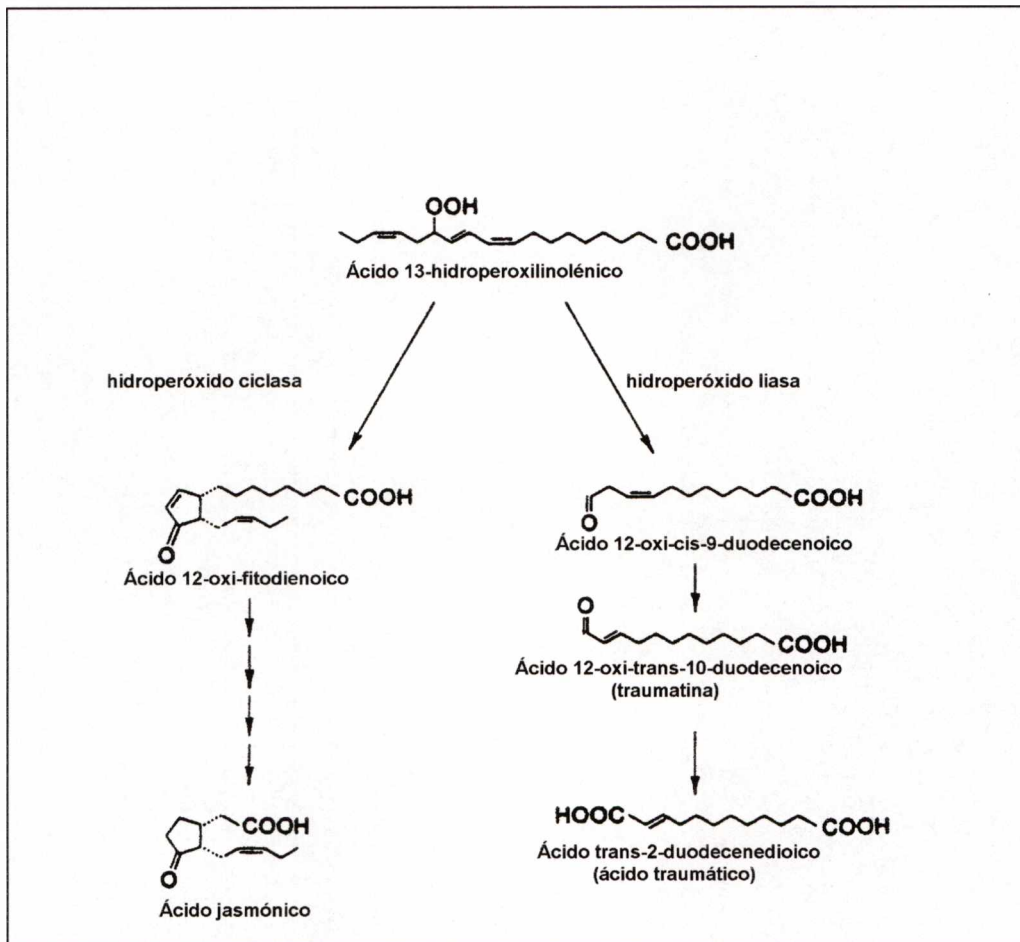


Figura III.2. Ruta para la biosíntesis de ácido jasmónico, traumatina y ácido traumático a partir del ácido 13-hidroperoxilinolénico, producto de la reacción de la lipoxigenasa (Extraído de Siedow, 1991).

El papel que juega la lipoxigenasa en la senescencia de los vegetales es probablemente la teoría más vieja de su función. Así, diversos estudios indicaron que un incremento en la actividad de la lipoxigenasa es un hecho común en tejidos vegetales senescentes. Sin embargo, algunos de estos estudios se realizaron en tejidos retirados de la planta por lo que, según Siedow (1991), ese incremento podría deberse a una respuesta inducida por la lesión y no a la senescencia propiamente dicha.

De acuerdo con Hildebrand y col. (1988) la inducción de LOX en vegetales como respuesta a lesiones por agentes biológicos externos tales como bacterias, hongos o virus podría tener ventajas por diferentes razones. Así, un incremento de su actividad inducido por un daño físico ocasionaría la producción de hidroperóxidos, varias especies que contienen radicales libres y productos de descomposición los cuales, a su vez, podrían provocar daños en la membrana celular conduciendo a una muerte celular localizada (Dixon y Lamb, 1990). Es así que, por ejemplo, se ha demostrado que el incremento de la peroxidación lipídica es un paso importante en el desarrollo de este mecanismo en cotiledones de pepino luego de la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* (Keppler y Novacky, 1986).

III . 2. OBJETIVOS

III . 2.1. Objetivo general

Caracterizar la actividad de LOX de la pulpa de berenjenas Black nite y analizar la variación de su actividad durante el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas.

III . 2.2. Objetivos específicos

A partir del objetivo general, se fijaron los siguientes objetivos específicos para el presente capítulo:

- a) Determinar las condiciones óptimas de actividad de LOX así como su estabilidad térmica.
- b) Estudiar la evolución de la actividad enzimática en los frutos sometidos a estrés térmico.

III . 3. MATERIALES Y MÉTODOS

III . 3.1. Material vegetal

Se trabajó con berenjenas del cultivar Black nite provenientes de una finca ubicada en la localidad de La Dársena del Departamento Banda, Provincia de Santiago del Estero, Argentina.

Los frutos se cosecharon manualmente, en horas tempranas de la mañana, con grado de madurez comercial correspondiente a un peso de 300 – 400 g. Las berenjenas se seleccionaron según forma, tamaño y ausencia de defectos.

Una vez en el laboratorio, los frutos se lavaron con agua clorada, se escurrieron y se dejaron secar.

III . 3.2. Almacenamiento

Los frutos se envasaron individualmente en bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) perforadas (190 perforaciones/m² de 13 mm de diámetro) para permitir un buen intercambio gaseoso. Posteriormente se conservaron a 3°C durante 12 días, usándose como testigo frutos almacenados a 20°C.

Se extrajeron muestras compuestas de cinco frutos cada una a los 0,5, 1, 2 y 3 días y, posteriormente, cada 3 días.

Para tiempos de almacenamiento iguales y superiores a los 3 días, una muestra de las berenjenas que permaneció a 3°C, fue transferida a 20°C durante 48 horas para simular condiciones de venta.

III . 3.3. Determinaciones

III . 3.3.1. Medición de la actividad enzimática

La actividad enzimática se midió siguiendo el método descrito por Zhuang y col. (1994) que se detalla a continuación.

a.- Preparación de las muestras

La muestra para análisis se preparó cortando una rodaja de 2 cm de espesor de la zona ecuatorial de cada fruto muestreado para cada tiempo y ensayo. Las rodajas se dividieron en cuatro porciones tomándose dos de los extremos opuestos a los que se les retiró la piel. Cada cuarto se dividió a su vez por la mitad constituyendo el pool de todas las rodajas la submuestra para el análisis.

b.- Extracción

Se pesó una muestra representativa del tejido vegetal, aproximadamente 10 g, y se trituró en una procesadora de uso doméstico conjuntamente con 1% p/p de PVPP y 30 ml de buffer fosfato 50 mM pH 7 al que se adicionó Tween 20 (0,1%).

Posteriormente se centrifugo el homogenato en una centrifuga refrigerada HERMLE Z 323 K, a 4°C y 10.000 r.p.m. durante 20 minutos.

Se realizaron, al menos, dos extractos para cada condición de ensayo.

c.- Actividad de la enzima

Inmediatamente antes del ensayo se preparó el sustrato fresco para lo cual se mezcló ácido linoleico 99% (SIGMA) con buffer fosfato 50 mM pH 7 adicionado de Tween 20 (0,1%). La concentración de ácido linoleico utilizada fue 1,12 mM.

La reacción se inició agregando 20 μ l del extracto de tejido (diluido 1:3 en el buffer de extracción) a 3 ml de la solución de sustrato. Posteriormente se registró el incremento de absorbancia (Inc. ABS) a 234 nm, a 30°C, durante 20 ciclos separados 20 segundos cada uno utilizándose como blanco 3 ml de solución de sustrato.

Para la medición de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UNICAM UV2 y en todos los casos la determinación se realizó por triplicado.

La actividad específica se calculó a partir de la porción lineal de la curva, una vez superada la fase lag, y se expresa como $(\text{Inc. ABS}) \text{ min}^{-1} (\text{g de proteína})^{-1}$.

III . 3.3.2. Caracterización de la enzima

a.- Efecto del pH

La extracción se realizó como se describió anteriormente utilizándose buffers fosfato 50 mM, barriendo un rango de pH entre 5 y 8, a los que se adicionó un 0,1 % de Tween 20.

El valor óptimo de pH obtenido en estos ensayos se utilizó en todas las determinaciones posteriores.

La actividad se determinó según lo indicado en el punto c del apartado anterior realizándose todas las determinaciones por triplicado.

b.- Optimización de la concentración de sustrato

Se realizó la extracción tal como se indicó en el punto b del apartado anterior.

Posteriormente, se prepararon soluciones de ácido linoleico en un rango de concentraciones de 0,48 a 1,12 mM midiéndose la actividad tal como se describió anteriormente y por triplicado.

c.- Efecto de la concentración de enzima

Se midió la actividad de LOX tal como se indicó en el apartado c del ítem anterior adicionando cantidades variables del extracto enzimático diluido obtenido estudiándose el efecto del porcentaje de extracto enzimático entre 0,5 y 1 % v/v con respecto al volumen final de la mezcla de reacción.

Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

d.- Efecto de la temperatura

La extracción y la determinación de actividad enzimática se realizaron según lo indicado en los puntos b y c del apartado anterior, respectivamente, modificándose sólo la temperatura a la que se realizó la cinética.

Se trabajó, por triplicado, con temperaturas desde 10° hasta 60°C utilizándose para la medición de absorbancia un espectrofotómetro HEWLETT PACKARD HP 8453E termostatzado con un baño de recirculación HAAKE.

Las mediciones posteriores se realizaron a la temperatura óptima determinada en esta etapa.

e.- Estabilidad térmica

El extracto enzimático obtenido se incubó a 0, 5, 10, 25 y 30°C durante 15, 30 y 60 minutos midiéndose posteriormente, y por triplicado, la actividad tal como se indicó anteriormente.

III . 3.3.3. Contenido de proteínas

Para la determinación de proteínas en los extractos, obtenidos como se indicó anteriormente para la determinación de actividad enzimática, se utilizó el método de Lowry (1951) empleando albúmina bovina como patrón.

a.- Curva de calibración

Se prepararon, en tubos de ensayo y por duplicado, las diluciones de la solución patrón mediante la adición de buffer fosfato 50 mM pH 7 en cantidad suficiente para completar 400 μ l a 0, 40, 80, 120 y 160 μ l de la solución de albúmina. Posteriormente, se agregó 2 ml del reactivo de Lowry, se agitó en Vortex y se dejó reposar durante 10 minutos.

El reactivo de Lowry se preparó mezclando 50 ml de solución de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0,1 N (Solución A) con 1 ml de solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1% - Tartrato de Na y K 2% (1:1) (Solución B).

A continuación, se agregaron 200 μl del reactivo de Folin – Ciocalteu (diluido 1:1 en agua destilada) agitándose nuevamente en Vortex y se dejó reposar por 30 minutos.

Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UNICAM UV2 y se obtuvo la ecuación correspondiente de la curva de calibración aplicando cuadrados mínimos.

b.- Dosaje de proteínas

En tubos de ensayo se mezclaron 40 μl del extracto de tejido vegetal con 360 μl de buffer. Posteriormente se hizo reaccionar la mezcla con los reactivos de Lowry y Folin – Ciocalteu tal como se describió en el apartado anterior.

Se leyó la absorbancia a 750 nm y se calculó, con la curva de calibración obtenida en cada caso, la cantidad de proteína del extracto.

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados, expresados en (g de proteína) (g de tejido vegetal fresco)⁻¹, se utilizaron para calcular la actividad enzimática específica.

III . 3.3.4. Análisis estadístico

Las experiencias se realizaron según un diseño factorial, siendo los factores la temperatura y el tiempo de almacenamiento, llevándose a cabo por lo menos cuatro ensayos completos.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA) de los resultados comparándose las medias con el test LSD para un nivel de significancia (α) igual a 0,05 utilizándose el software estadístico SPSS 10.0.

III . 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III . 4.1. Caracterización de la enzima

III . 4.1.1. Actividad enzimática

La reacción catalizada por LOX de berenjenas mostró un período de inducción por lo que para la actividad específica se calculó a partir de la porción lineal de la curva, una vez superada esta fase (datos no mostrados).

Suurmeijer y col. (1998) y Schilstra y col. (1993) encontraron un comportamiento similar al analizar la cinética de LOX de tomate y de lipoxigenasa-1 de soja, respectivamente.

III . 4.1.2. Efecto de la concentración de sustrato

La actividad de lipoxigenasa aumentó con la concentración de sustrato tal como puede observarse en la Figura III.3., obteniéndose valores de actividad máximos a partir de concentraciones de sustrato de 0,8 mM. Es por ello que, para las subsecuentes determinaciones de actividad de la enzima, se utilizó una solución de ácido linoleico (LA) 1,12 mM a fin de garantizar el exceso de sustrato.

El valor máximo promedio de actividad específica obtenido fue de 11,54 (Inc. ABS) min⁻¹ (mg de proteína)⁻¹.

La cinética observada corresponde a una curva sigmoideal. Un comportamiento similar fue observado por Suurmeijer y col. (1998) al trabajar con extractos enzimáticos obtenido de tomates cv. Trust al agregar Tween 20 tanto a la solución de sustrato como al buffer de extracción.

El agregado de detergentes como el Tween 20 se debe a que, en los estudios espectrofotométricos de la reacción de LOX a pH neutro, se requiere superar la baja solubilidad de los ácidos grasos y, por lo tanto, la turbidez visual. El detergente forma micelas que solubilizan y clarifican ópticamente las suspensiones. Por otra parte, Pinsky y Grossman (1971) demostraron que la

adición de otro detergente (Triton) aumentaba tanto la solubilización como la actividad de LOX de berenjenas.

Debido a que con las preparaciones sin el agregado de Tween 20 se obtuvieron curvas del tipo Michaelis-Menten, Suurmeijer y col. (1998) atribuyeron este comportamiento al estado de agregación de los ácidos grasos en un medio de reacción heterogéneo que involucra un sustrato lipídico y un extracto enzimático acuoso, concluyendo que la lipoxigenasa de tomate posee una mayor afinidad por el ácido linoleico en forma monomérica que incorporado en micelas.

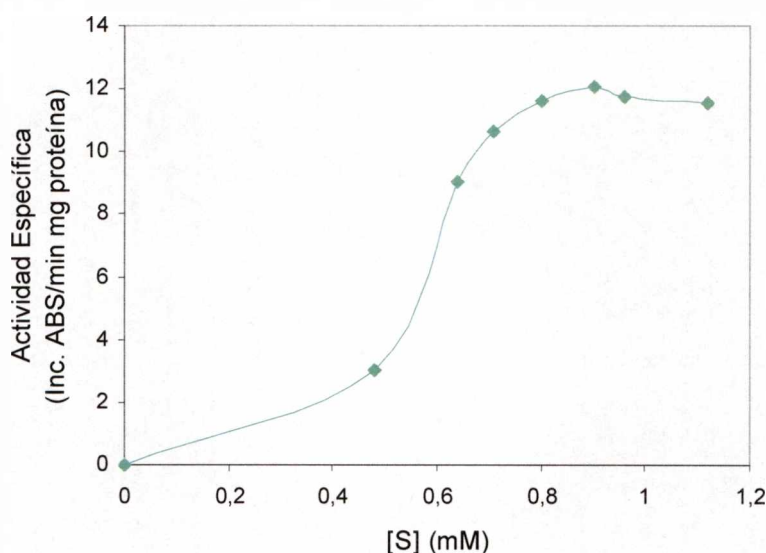


Figura III.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de lipoxigenasa en berenjenas. $LSD_{0,05} = 0,84$.

Cistola y col. (1988) establecieron que, dependiendo del pH y de la concentración del ácido graso, el sustrato puede estar presente como monómeros, micelas, bicapas o como una fase oleica separada.

Es así que, López-Nicolás y col. (2001), en base a trabajos previos que demostraron la habilidad de la ciclodextrinas (CDs) para solubilizar ácidos grasos en ensayos con LOX, realizaron un estudio usando estos compuestos para solubilizar el ácido linoleico y utilizaron LOX extraída de berenjenas cv. Belleza negra. Entre las ventajas atribuidas a las CDs citaron la transparencia de la solución inclusión-complejo y la baja absorción de la β -CD, aún a muy

bajas longitudes de onda, lo que permitió la caracterización UV de la reacción. Definieron una concentración micelar crítica (CMC) como el valor de la concentración de ácido linoleico a la cual el ácido graso comienza a agregarse demostrando una alta dependencia de la cinética enzimática con las propiedades fisicoquímicas del ácido. Así, cuando usaron concentraciones de LA menores a CMC (20 μM) (forma monomérica), el sustrato fue rápidamente consumido y la enzima mostró un comportamiento cinético Michaeliano con valores de K_m y V_{\max} de 1,4 μM y 2,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg de proteína) $^{-1}$, respectivamente. Cuando la concentración de LA estuvo por encima de CMC, el LA formó agregados que activaron la LOX. Atribuyeron este doble comportamiento cinético observado a una cooperatividad aparente del sustrato interpretada como una actividad sustrato-agregación dependiente similar a la descrita para LOX de papas y otras enzimas.

III . 4.1.3. Efecto de la concentración de enzima

La actividad específica mostró un incremento lineal con la concentración de la enzima, obteniéndose valores de incremento de dicha actividad iguales a 1,32 por μl de extracto ($r^2 = 0,99$) (datos no mostrados). Las determinaciones subsiguiente se realizaron con una concentración del 0,7 % v/v de extracto respecto del volumen final de la mezcla de reacción, correspondiendo a la porción lineal de la curva.

III . 4.1.4. Efecto del pH

La Figura III.4. muestra la variación de la actividad específica de LOX en función del pH. Tal como puede observarse, la actividad aumentó a medida que aumentó el pH obteniéndose el valor máximo (29,38 (Inc. ABS) min^{-1} (mg de proteína) $^{-1}$) a pH 7. Para valores mayores, la actividad disminuyó gradualmente alcanzándose un valor, para pH 8, igual al 75% del valor máximo. Esta fuerte disminución de la actividad a pH básicos, típica de otras

LOX, también fue observada por Grossman y col. (1972) y López-Nicolás y col. (2001) trabajando con LOX de berenjenas.

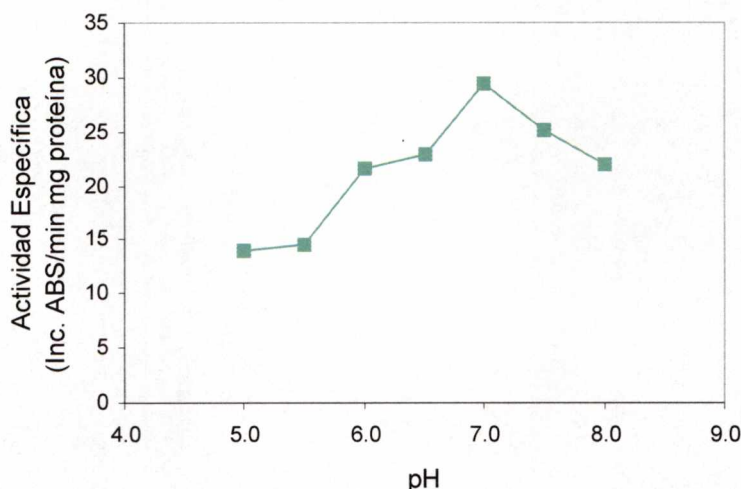


Figura III.4. Variación de la actividad de lipoxigenasa en función del pH. $LSD_{0,05} = 2,44$.

Zhuang y col. (1994) encontraron que el pH óptimo de esta enzima en floretes de brócoli cv. Iron Duke era 5,5 – 6,0. Hildebrand y Hymowitz (1981) determinaron como pH óptimo valores de 6,8 ó 9 en LOX de embriones de soja. Ridolfi y col. (2002) notaron la máxima actividad en LOX de diferentes cultivares de aceitunas a pH 6,0 utilizando buffer fosfato 0,2 M si bien determinaron también una apreciable actividad en el rango de 5,0 a 7,0. Kuribayashi y col. (2002) encontraron un pH óptimo de 8,0 con un pico menor a 4,5 al trabajar con LOX de hongos. Las diferencias encontradas se atribuyen a las diferentes isoformas de LOX estudiadas.

En el caso de berenjenas, López-Nicolás y col. (2001) trabajando con LOX del cv. Belleza negra encontraron un pH óptimo cercano a la neutralidad. Asimismo, Grossman y col. (1972) y Nakayama y col. (1995) determinaron un pH óptimo de 7,0 usando el ensayo espectrofotométrico y la oxidación del linoleato, respectivamente, para la determinación de la actividad. Estos resultados coinciden con los encontrados en nuestros ensayos.

III . 4.1.5. Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la actividad para el rango de temperaturas estudiadas (10°C – 60°C) se muestra en la Figura III.5. Tal como puede observarse la actividad de la enzima aumentó gradualmente hasta alcanzar el valor máximo de 58,69 (Inc. ABS) min⁻¹ (mg de proteína)⁻¹ a 30°C. A partir de dicha temperatura la actividad comenzó a disminuir existiendo, en todos los casos, diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$).

La actividad a 30°C fue, aproximadamente, 6 veces mayor que a 10°C y 2 veces mayor que a 60°C.

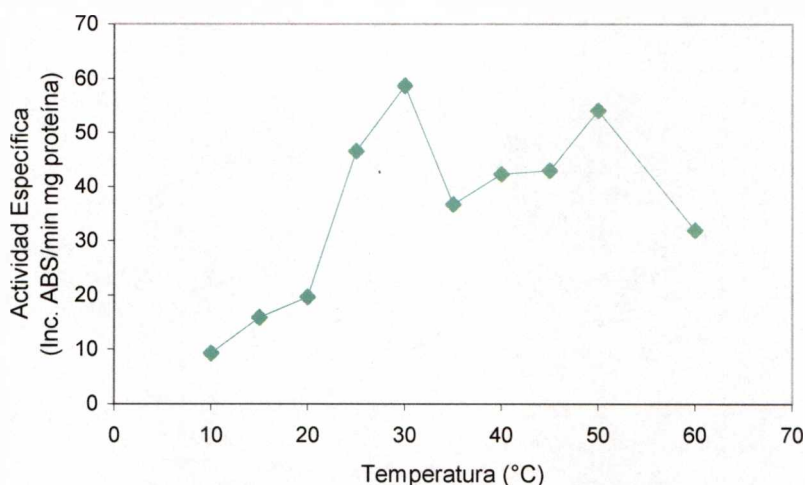


Figura III.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lipoxigenasa en berenjenas. $LSD_{0,05} = 3,39$.

La temperatura óptima obtenida coincide con la encontrada por Todd y col. (1992) y Ridolfi y col. (2002) en tomates y aceitunas, respectivamente. Es por ello que todas determinaciones posteriores de actividad enzimática se realizaron a 30°C.

III . 4.1.6. Estabilidad térmica de la enzima

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.6 en la que se representan los valores relativos de la actividad enzimática residual con respecto al valor inicial en función del tiempo de incubación a las distintas temperaturas ensayadas.

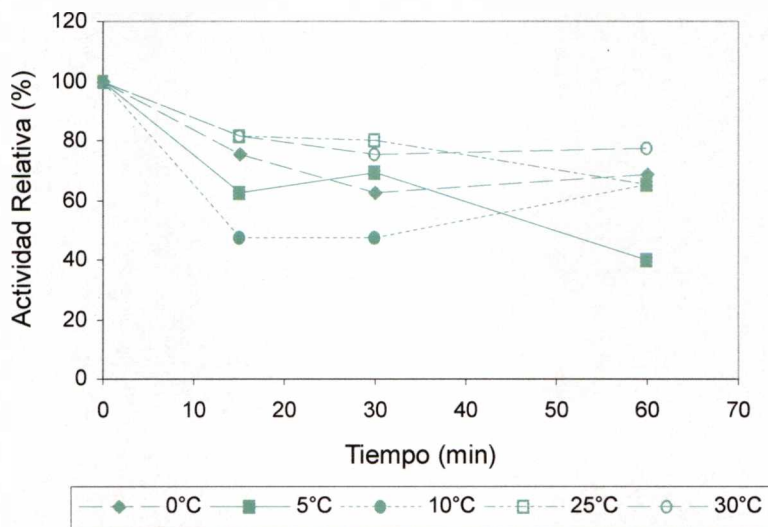


Figura III.6. Estabilidad térmica de LOX de berenjenas Black nite en función del tiempo de incubación a diferentes temperaturas. Los datos se expresan en unidades relativas al valor inicial. $LSD_{0,05} = 0,07$.

En todos los casos, la actividad residual disminuyó luego de 15 min de incubación, siendo menor el valor obtenido a 10°C (47,64%). Los extractos incubados a 0°, 25° y 30°C mantuvieron actividades próximas al 80%.

No se encontraron diferencias significativas a 30°C para los tiempos de incubación mayores ensayados. Sin embargo, sí se determinó una menor actividad residual al cabo de 60 min de incubación a 25°C.

La menor actividad residual, luego de 60 min de incubación, se registró a 5°C con un valor promedio próximo al 40% del valor inicial. A 0°, 10° y 25°C la actividad residual promedio fue superior al 65% para el mismo tiempo de incubación, sin encontrarse diferencias significativas entre ellas.

No obstante, resultados diferentes fueron informados por otros autores. Así, Grossman y col. (1972) determinaron que la LOX purificada de berenjenas en buffer 0,2 M y pH 6,5 no perdió actividad a temperatura ambiente por 24 h y Kuribayashi y col. (2002), quienes realizaron pretratamientos de la enzima purificada de hongos a varias temperaturas por 5 min, revelaron que ésta era relativamente estable por debajo de 40°C pero perdía rápidamente actividad por encima de 40°C.

Por otra parte, Suurmeijer y col. (1998) determinaron que la enzima purificada de tomate permaneció estable durante una semana cuando se almacenó, en buffer fosfato pH 6,5, a 4°C disminuyendo su actividad en un 50%, aproximadamente, al cabo de dos meses. Asimismo, informaron que, a temperatura ambiente, la enzima perdió su actividad en el día.

III . 4.2. Modificaciones de la actividad de LOX durante el almacenamiento

La Figura III.7 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de almacenamiento de los frutos almacenados a 3°C, almacenados a 3°C y transferidos a 20°C por 48 h así como los de las berenjenas testigo almacenadas a 20°C. Tal como puede observarse, se registró un incremento de la actividad ($\cong 61\%$) en los frutos almacenados a 3°C durante las primeras horas de almacenamiento para luego disminuir a los niveles iniciales. A partir del tercer día, donde el daño comienza a manifestarse, se registró un aumento paulatino en la actividad específica para disminuir nuevamente a los valores iniciales a los 12 días, al cabo de los cuales los síntomas, más que evidentes, tornaron los frutos no comercializables.

Los frutos transferidos a 20°C por 48 horas presentaron, en general, actividades menores así como también los frutos control mantenidos a 20°C durante todo el ensayo. Luego de 12 días de almacenamiento, tanto los frutos testigos como los que sufrieron el pasaje por 48 h a 20°C, presentaron los valores más bajos de actividad ($\cong 20\%$ y $\cong 14\%$, respectivamente, con respecto a los frutos refrigerados).

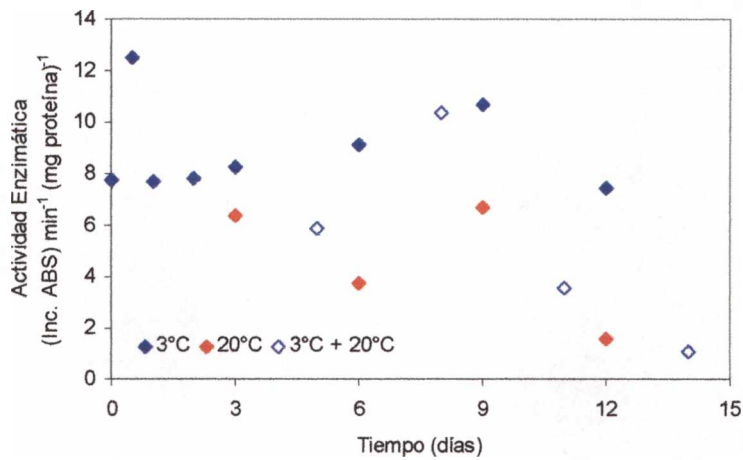


Figura III.7. Actividad de lipoxigenasa en berenjenas Black nite durante el almacenamiento a 3°C, almacenadas a 3°C y transferidas a 20°C por 48 h y almacenadas a 20°C. $LSD_{0,05} = 1,00$.

Zhuang y col. (1997) encontraron una declinación lineal en la actividad de LOX en muestras de floretes de brócoli cv. Iron Duke almacenados a 23°C con un 63% menos de actividad al final del período de almacenamiento (144 días) mientras que en las muestras almacenadas a 2°C no registraron cambios significativos durante el almacenamiento.

III . 5. CONCLUSIONES

- En la oxidación del LA catalizada por LOX de berenjenas Black nite se observó un período de inducción.
- Los resultados de la caracterización enzimática indicaron que el pH y la temperatura óptima para su reacción fueron 7,0 y 30°C, respectivamente, aumentando en forma lineal su actividad al aumentar la concentración de LOX en el medio de reacción.
- La enzima fue más estable a 30°C luego de 60 min de incubación manteniendo su actividad en niveles cercanos al 80%.
- Se registró un incremento de la actividad específica de LOX durante las primeras horas de almacenamiento de los frutos a 3°C.
- Tanto el pasaje a 20°C como el almacenamiento continuo a 20°C proporcionaron niveles de actividad menores registrándose el mínimo, en ambos casos, a los 12 días de conservación.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

IV . 1. INTRODUCCIÓN

IV . 1.1. Membranas biológicas

Las membranas biológicas son conjuntos organizados constituidos principalmente por proteínas y lípidos que le confieren a las células su individualidad al separarlas de su entorno.

Las membranas plasmáticas de las células actúan como barreras selectivamente permeables permitiendo el pasaje de algunas sustancias como agua y gases y limitando el pasaje de otras que, a fin de proporcionar el control necesario de las concentraciones intracelulares, requieren de procesos de transporte (Stanley, 1991).

Las células eucarióticas contienen además membranas intracelulares que delimitan estructuras tales como mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, núcleo, etc. (Stanley, 1991).

Las membranas controlan también el flujo de información entre las células y su medio ambiente. Contienen receptores específicos para los estímulos externos y algunas generan señales químicas o eléctricas por lo que juegan un papel importante en las comunicaciones biológicas.

Evidencia experimental ha demostrado que la senescencia de varias frutos, vegetales y flores está asociada con la degradación de membranas biológicas y que la pérdida de su integridad es un rasgo fundamental de la senescencia (Palma y col., 1995).

Los procesos deteriorativos de la membrana incluyen temperaturas de transición de fase elevadas de la mayoría de sus lípidos y una disminución de su fluidez (Thompson, 1988; Marangoni y col., 1990), hidrólisis de fosfolípidos de membrana a ácidos grasos libres constituyentes y peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados con la correspondiente producción de radicales libres (Thompson, 1988; Paliyath y Droillard, 1992). Estos radicales libres catalizan reacciones de deterioro posteriores que llevan a la muerte celular y a una disminución de la calidad en frutas, vegetales y flores (Palma y col., 1995).

Condiciones de estrés de los vegetales tales como el daño por frío producen una degradación de la membrana similar a la senescencia acelerada, vía mecanismos bioquímicos similares a los descritos anteriormente (Marangoni y col., 1989; Todd y col., 1992).

IV . 1.2. Estructura de la membrana

Las membranas vegetales se identifican como bicapas fluidas de fosfolípidos que contienen proteínas y esteroides intercalados (Marangoni y col., 1996).

El modelo más aceptado de membrana biológica es el propuesto por Singer y Nicolson en 1972 denominado "mosaico fluido" que sostiene: 1) los lípidos y proteínas están dispuestos en una especie de organización en mosaico, y 2) las membranas biológicas son estructuras casi líquidas, en las cuales tanto los lípidos como las proteínas integrales pueden realizar movimientos de traslación dentro de la bicapa (Stanley, 1991).

La Figura IV.1 muestra una representación esquemática de las características principales de este modelo. Los lípidos complejos anfipáticos, que forman la bicapa lipídica, proporcionan la matriz fluida en la que se intercalan las proteínas que pueden estar localizadas en una interfase o atravesar la membrana, expuestas a ambas interfases (Raison, 1980).

Esta estructura maximiza tanto la interacción hidrofóbica de las cadenas alquílicas como las atracciones hidrofílicas de los grupos polares con el medio acuoso y por lo tanto proporciona una estructura termodinámicamente estable. Sin embargo, debido a que no existen fuerzas de atracción fuertes entre las cadenas alquílicas adyacente, la estructura es también fluida (Raison, 1980).

La fluidez de la membrana es esencialmente una propiedad de los lípidos y su grado de insaturación juega un rol fundamental en la determinación de la temperatura de transición de fase (Stanley, 1991).

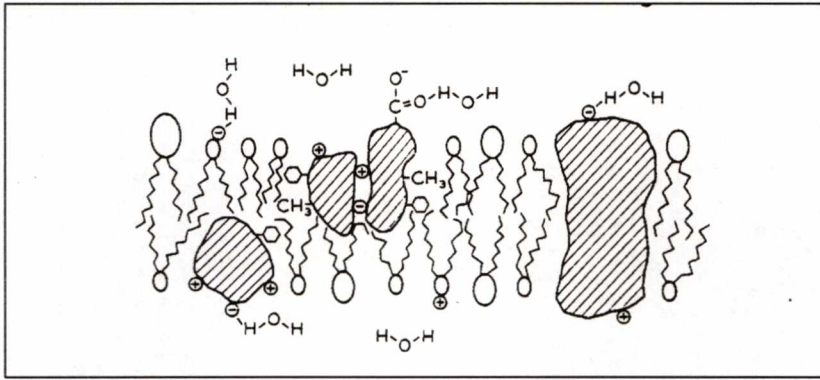


Figura IV.1. Vista esquemática de la sección transversal de una membrana. Los grupos cabezas de los lípidos polares están representados por óvalos y las cadenas hidrocarbonadas por líneas quebradas. Las proteínas integrales se muestran como áreas sombreadas y aparecen como unidades simples intercaladas en ambas monocapas lipídicas, como agregados de dos subunidades en una monocapa o como unidades simples que atraviesan la bicapa. Las regiones hidrofílicas de proteínas y lípidos están representadas como cargas \oplus y \ominus . Las regiones hidrofóbicas están representadas por CH_3 y grupos \equiv . (Extraído de Raison, 1980).

IV . 1.3. Lípidos de membrana

Los tres tipos principales de lípidos de membrana son los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol.

Muchos fosfolípidos contienen un ácido graso saturado (normalmente palmítico) en la posición sn-1 del glicerol; la posición sn-2 está generalmente ocupada con un ácido graso insaturado de cadena larga (oleico, linoleico o linolénico) y en la posición sn-3 se encuentra el grupo polar que contienen el fosfato (Stanley, 1991; Leshem, 1992).

Las cadenas de ácidos grasos de los lípidos pueden encontrarse, en las bicapas, en forma ordenada y rígida o en forma relativamente desordenada, es decir, en estado fluido. En el estado ordenado, todos los enlaces C-C tienen conformación *trans*, mientras que, en estado desordenado, algunos están en conformación *gauche*. La transición de estado rígido a estado fluido se presenta cuando la temperatura supera la temperatura de fusión. Esta temperatura de transición depende de la longitud de las cadenas de ácidos grasos, de su grado de insaturación y del contenido de esteroides (Stanley, 1991).

Los lípidos en la bicapa son capaces de moverse transversalmente en el plano de la membrana, pero la libertad de este movimiento está determinada por la temperatura y la fase o estado de las estructuras lipídicas (Stanley, 1991). El concepto de fluidez de la membrana se refiere este movimiento.

IV . 1.4. Mecanismos de deterioro de la membrana

Es posible valorar el deterioro de la membrana directamente evaluando cambios en su composición, estructura o funciones tales como fluidez o permeabilidad, o indirectamente monitoreando cambios químicos que incluyen el estado de peroxidación de los lípidos y la pérdida de funcionalidad proteica, por ejemplo actividad o desnaturalización de enzimas (Stanley, 1991).

Así, los cambios biofísicos en los lípidos de membrana y su peroxidación, enzimática o no enzimática, alteran sus propiedades y ocasionan el intercambio iónico y la descompartimentalización celular, entre otros efectos (Marangoni y col., 1996).

Una hipótesis corriente es que el daño por frío es esencialmente una forma acelerada de senescencia (Lyons y Breidenbach, 1987) en la cual los efectos adversos de la baja temperatura en el metabolismo lipídico y la función de la membrana, produce una cascada de reacciones deteriorativas que resultan finalmente en la muerte celular. La descomposición de los lípidos de membrana por hidrolasas acilicas que producen ácidos grasos libres se cree que es uno de los primeros eventos en la senescencia (Whitaker, 1991a). Como consecuencia de esta deacilación, particularmente de los glicolípidos, se produce la liberación y acumulación de ácidos grasos libres (Zhuang y col., 1994). La degradación de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) por la lipoxigenasa, generando peróxidos y radicales libres, contribuye a la senescencia postcosecha de frutas y vegetales (Mazliak, 1987; Watada y col., 1990).

Estudios realizados comparando los efectos del enfriamiento y maduración en el contenido de lípidos de pericarpio de tomate han mostrado que se produce una pérdida de fosfolípidos y un incremento en ácidos grasos,

si bien estos cambios son relativamente pequeños a las temperaturas de refrigeración (Whitaker, 1991a).

El mecanismo propuesto de senescencia en tejidos vegetales implica una serie de etapas catabólicas en las cuales se degradan los fosfolípidos y se liberan ácidos poliinsaturados que son atacados por las lipoxigenasas ligadas a la membrana produciendo hidroperóxidos (Fobel y col., 1987; Thompson, 1984a). La pérdida de fosfolípidos, la acumulación de hidroperóxidos y la generación de radicales libres en las membranas celulares se piensa que desestabiliza la bicapa lipídica lo que resulta en una pérdida de la función de la membrana celular (Parkin y col., 1989; Thompson, 1984b).

Por otra parte, existe evidencia que el grado de instauración de los ácidos grasos de los lípidos de membrana así como la peroxidación lipídica están relacionadas con la incidencia de la severidad del daño por frío en productos sensibles (Parkin y col., 1989).

La iniciación de la peroxidación ocurre a causa del ataque de cualquier especie química que tiene reactividad suficiente para quitar un átomo de hidrógeno de un metilcarbono en un ácido graso (Stanley, 1991) y el contenido de malondialdehído (MDA) se usa generalmente como un indicador de la peroxidación lipídica resultante del estrés oxidativo (Smirnoff, 1995).

IV . 2. OBJETIVOS

IV . 2.1. Objetivo general

Analizar el deterioro de las membranas de berenjenas Black nite sometidas a daño por frío evaluando los cambios en la composición lipídica y estudiando su estado de peroxidación.

IV . 2.2. Objetivos específicos

A partir del objetivo general, se fijaron los siguientes objetivos específicos para el presente capítulo:

- a) Monitorear los cambios de los principales ácidos grasos durante el almacenamiento a 3°C de berenjenas Black nite comparándolos con los valores obtenidos durante la senescencia de frutos almacenados a 20°C.
- b) Estudiar las modificaciones en la concentración de fosfolípidos durante el almacenamiento refrigerado de berenjenas Black nite.
- c) Analizar el efecto del estrés por bajas temperaturas en el grado de peroxidación de los lípidos de membrana.

IV . 3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV . 3.1. Material vegetal

Se trabajó con berenjenas del cultivar Black nite provenientes de una finca ubicada en la localidad de La Dársena del Departamento Banda, Provincia de Santiago del Estero, Argentina.

Los frutos se cosecharon manualmente, en horas tempranas de la mañana, con grado de madurez comercial correspondiente a un peso de 300 – 400 g. Las berenjenas se seleccionaron según forma, tamaño y ausencia de defectos.

Una vez en el laboratorio, los frutos se lavaron con agua clorada, se escurrieron y se dejaron secar.

IV . 3.2. Almacenamiento

Los frutos se envasaron individualmente en bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) perforadas (190 perforaciones/m² de 13 mm de diámetro) para permitir un buen intercambio gaseoso. Posteriormente se conservaron a 3°C durante 12 a 17 días, usándose como testigo frutos almacenados a 20°C.

Se extrajeron muestras compuestas de cinco frutos cada una a los 0,5, 1, 2, 3 días y, posteriormente, cada 3 días. A los 3 días y subsiguientemente a cada tiempo, una muestra de las berenjenas que permanecieron a 3°C, fue transferida a 20°C durante 48 horas para simular condiciones de venta.

IV . 3.3. Determinaciones

IV . 3.3.1. Lípidos totales

a.- Preparación de la muestra

La muestra para análisis se preparó cortando una rodaja de 2 cm de espesor de la zona ecuatorial de cada fruto muestreado para cada tiempo y ensayo. Las rodajas se dividieron en dos porciones tomándose una de ellas a la que se le retiró la piel y las semillas. Posteriormente las muestras se congelaron, perfectamente acondicionadas en papel de aluminio y film auto adherente, hasta el momento de su análisis. La submuestra para el análisis se obtuvo dividiendo las muestras por la mitad.

b.- Extracción

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Whitaker (1991a).

Se homogeneizó en una procesadora de uso doméstico el tejido vegetal congelado y se pesó aproximadamente 10 g del mismo en un erlenmeyer mezclándose con 50 ml de solución de CHCl_3 – MeOH (2:1) acidificada con 0,1% de ácido acético.

La mezcla se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente y se filtró bajo vacío a través de un embudo de vidrio fritado reservándose el extracto obtenido.

El residuo se reextrajo con 40 ml de la solución de CHCl_3 – MeOH en las mismas condiciones que en el caso anterior y se filtró nuevamente.

Luego se combinaron ambos extractos, se transfirieron a una ampolla de decantación y se lavaron con 20 ml de solución de ClNa 0,8 % (2 veces) y 20 ml de solución MeOH – H_2O (1:1).

El extracto clorofórmico obtenido, conteniendo los lípidos totales (LT), se evaporó bajo corriente de N_2 hasta peso constante.

Los resultados se expresan en mg LT/g tejido fresco.

c.- Resuspensión del residuo

El residuo obtenido fue resuspendido en 5 ml de una solución de MeOH + 0,001% BHT + 2 % H_2SO_4 separándose 2,5 ml para la determinación de ácidos grasos y 2,5 ml para la determinación de fosfolípidos.

Ambos extractos lipídicos se conservaron a -15°C en frascos color caramelo herméticamente sellados bajo atmósfera de N_2 hasta el momento de su análisis.

IV . 3.3.2.- Ácidos grasos

a.- Metilación de los ácidos grasos

La metilación se realizó según la técnica descrita por Zhuang y col. (1994) a partir del método desarrollado por Dahmer y col. (1989).

Se transfirieron 2,5 ml del extracto lipídico a un tubo de ensayo al que se le agregó 500 μl de ácido heptadecanoico 1,85 mM (17:0, patrón interno) preparado con el mismo solvente en el que se resuspendieron los lípidos. Esta mezcla se concentró hasta 0,5 ml en baño maría a 90°C y se enfrió 4°C . Los ácidos grasos metilados se extrajeron posteriormente con 2 porciones de 0,5 ml de hexano, calidad cromatográfica, durante 1 hora a 4°C .

Los extractos se transfirieron a frascos herméticos color caramelo, especialmente diseñados, conservándose a -15°C bajo atmósfera de N_2 para su cuantificación.

El diseño de los frascos implicó la fabricación de tapas de teflón, de 1,3 cm de alto y 2,5 cm de diámetro, con un asiento de 3 mm de profundidad en su parte central a los efectos de colocar un septum de 11 mm de diámetro. Asimismo se realizó una perforación a través de la tapa que permitió la introducción de una jeringa Hamilton para la extracción de la muestra.

b.- Identificación y cuantificación

Se realizó por cromatografía gaseosa empleándose un cromatógrafo KONIC HRGC 3000C e inyectándose, con jeringa Hamilton, alícuotas de 1 – 3 μl de muestra manteniéndose el inyector a una temperatura de 250°C .

Se usó N_2 como gas de corrida con un caudal de 1,8 ml/min y una columna capilar J & W SCIENTIFIC DB17 (diámetro: 0,25 mm; longitud: 30 m y

espesor de film: 0,25 μm). Se operó en modo splitless/split (caudal: 27,3 ml/min) y se utilizó un detector de ionización de llama a 270°C.

El programa de temperaturas utilizado para la separación y cuantificación fue 15 min a 220°C, incremento de 10°C/min hasta 240°C, temperatura que se mantuvo durante 20 minutos.

La cuantificación se realizó utilizando el método de patrón interno. Se utilizó ácido heptadecanoico como tal el que debió metilarse a fin de agregarse a los estándares de ácidos grasos. Para ello se disolvió 25 mg en 2,5 ml de MeOH + 0,001% BHT + 2 % H_2SO_4 y se derivatizó tal como se describió en el apartado anterior. La solución concentrada se extrajo con un total de 3 ml de hexano, calidad cromatográfica, llevándose luego a 25 ml con el mismo solvente.

Los estándares de ésteres metilados de ácidos grasos (SIGMA), a saber: palmítico (6%), esteárico (3%), oleico (35%), linoleico (50%), linolénico (3%) y araquidónico (3%) disponibles en ampollas de 100 mg, se diluyeron en hexano agregándose a esta solución cantidad suficiente del patrón derivatizado para alcanzar rangos similares de concentración los que variaron entre $2 \cdot 10^{-4}$ % y $33,7 \cdot 10^{-4}$ %.

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresan en % ácidos grasos/ LT y μg de ácido graso / g LT.

IV . 3.3.3.- Fosfolípidos

Se utilizó la técnica descrita por Ames (1966) para la determinación de fosfato total cuya metodología se describe a continuación:

En tubos de ensayo Pirex se colocaron 200 μl del extracto lipídico a los que se adicionó 90 μl de una solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% preparada con alcohol etílico de 96°. Luego se secaron en llama directa hasta desaparición de humos marrones. Simultáneamente, se preparó el blanco reemplazando el extracto lipídico por agua destilada y siguiendo la misma metodología.

Una vez fríos, se agregaron 900 μl de HCl 0,5 N y se calentaron a baño maría en ebullición durante 15 minutos a fin de hidrolizar a fosfato cualquier pirofosfato formado durante el proceso de calcinación. Durante esta etapa, los tubos permanecieron tapados para minimizar la evaporación.

Nuevamente los tubos se enfriaron y se adicionó, a cada uno, 2,1 ml de la mezcla de reacción preparada en el momento.

La mezcla de reacción se obtuvo combinando solución de ácido ascórbico al 10% (1 parte) y solución de molibdato de amonio tetrahidratado al 0,42% en H_2SO_4 1 N (6 partes).

Posteriormente, los tubos se incubaron en un baño termostático a 45°C durante 20 minutos leyéndose a continuación su absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro UNICAM UV2.

Para la cuantificación se utilizó la siguiente equivalencia: 0,01 μmoles de fosfato orgánico \equiv 0,240 de absorbancia y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados se informan en μmoles de fosfato/g LT.

IV . 3.3.4. Peroxidación de lípidos

El grado de peroxidación se determinó a través de la cuantificación de malondialdehído (MDA) y monoaldehídos (MA), sustancias estas que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) según la técnica descrita por Zhuang y col. (1997).

a.- Preparación de la muestra y extracción

La muestra para análisis se preparó cortando una rodaja de 2 cm de espesor de la zona ecuatorial de cada fruto muestreado para cada tiempo y ensayo. Las rodajas se dividieron en cuatro porciones tomándose dos de los extremos opuestos a los que se les retiró la piel. Cada cuarto se dividió a su vez por la mitad constituyendo el conjunto de todas las rodajas la submuestra para el análisis.

Se pesó una muestra representativa del tejido vegetal, aproximadamente 10 g, y se trituró en una procesadora de uso doméstico conjuntamente con 1% p/p de PVPP y 30 ml de buffer fosfato 50 mM (pH 7) al que se adicionó Tween 20 (0,1%).

Posteriormente se centrifugó el homogeneizado en una centrífuga refrigerada HERMLE Z 323 K, a 4°C y 10.000 r.p.m. durante 20 minutos.

Los extractos se conservaron congelados en frascos color caramelo hasta su cuantificación.

b.- Cuantificación

A 200 µl del extracto obtenido se le adicionaron 2800 µl de solución de ácido tricloacético (TCA) al 20 % + ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5 %. La mezcla se realizó en tubos de centrifuga de polipropileno los que posteriormente fueron incubados a baño maría a 95°C durante 30 minutos.

Inmediatamente de extraídos, fueron transferidos a un baño de hielo para enfriarlos y, posteriormente, se centrifugaron a 10.000 r.p.m. y 5°C durante 10 minutos.

A continuación, se leyó la absorbancia de las muestras a 532 nm (MDA) y 455 nm (MA) en un espectrofotómetro UNICAM UV2.

Para su cuantificación se utilizaron como coeficientes de extinción (E) $1,56 \times 10^5 \text{ (M/cm)}^{-1}$ para MDA y $0,457 \times 10^6 \text{ (M/cm)}^{-1}$ como coeficiente promedio para cinco aldehídos (propanal, butanal, hexanal, heptanal y propanal-dimetilacetal) (MA) (Zhuang y col., 1997).

Las determinaciones se efectuaron por triplicado y los resultados se informan en µmoles de MDA ó MA/g tejido fresco.

IV . 3.3.5. Análisis estadístico

Las experiencias se realizaron según un diseño factorial llevándose a cabo por lo menos cuatro ensayos.

Los factores analizados fueron temperatura y tiempo de almacenamiento.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA) de los resultados comparándose las medias con el test LSD para un nivel de significancia (α) igual a 0,05 utilizándose el software estadístico SPSS 10.0.

IV . 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV . 4.1. Ácidos grasos

Se sabe que los lípidos juegan un papel importante como uno de los principales constituyentes de las membranas así como también se reconoce su bajo contenido en frutas y hortalizas. Es así que, en nuestras determinaciones, los valores de lípidos totales no superaron el 0,1 % siendo su valor promedio de $0,068 \pm 0,01\%$ a lo largo de todo el período de almacenamiento.

Los principales ácidos grasos que se detectaron en las berenjenas fueron palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico, los que constituyeron, aproximadamente, el 32% de los lípidos totales en los frutos recién recolectados.

Los ácidos esteárico y araquidónico fueron los que se encontraron en menor proporción. Las cantidades de oleico y linolénico siguieron en orden de importancia, en proporciones similares, y los ácidos palmítico y linoleico fueron los más abundantes siendo este último el ácido graso predominante. La Tabla IV.1 muestra los porcentajes promedios de dichos ácidos referidos a los lípidos totales (LT) y a los ácidos grasos libres (FFA).

ÁCIDO GRASO	% LT	% FFA
PALMÍTICO	7,18	22,71
ESTEÁRICO	0,33	1,04
OLEICO	5,55	17,54
LINOLEICO	12,21	38,60
LINOLÉNICO	5,66	17,88
ARAQUIDÓNICO	0,70	2,22

Tabla IV.1. Composición de ácidos grasos de berenjenas Black nite.

Durante nuestros ensayos se observó que la temperatura de crecimiento de los frutos influyó en la composición de ácidos grasos. En la Figura IV.1. se presentan los resultados obtenidos de ensayos realizados con berenjenas cosechadas en Diciembre y Febrero. Los grados-días acumulados para un período de 13 días fueron $78,8^{\circ}\text{C}$ y $113,2^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Rodríguez (2000) determinó que el período de crecimiento de berenjenas cv. Black nite fue de 13 días, contado a partir de tercer día de la caída de los pétalos de las flores, al cabo de los cuales los frutos alcanzaron el tamaño óptimo para su comercialización. Por ello, se calcularon los grados-día acumulados a partir de los datos de temperaturas medias diarias registrados 13 días antes de la fecha de recolección y tomando como temperatura base para la fructificación 15°C.

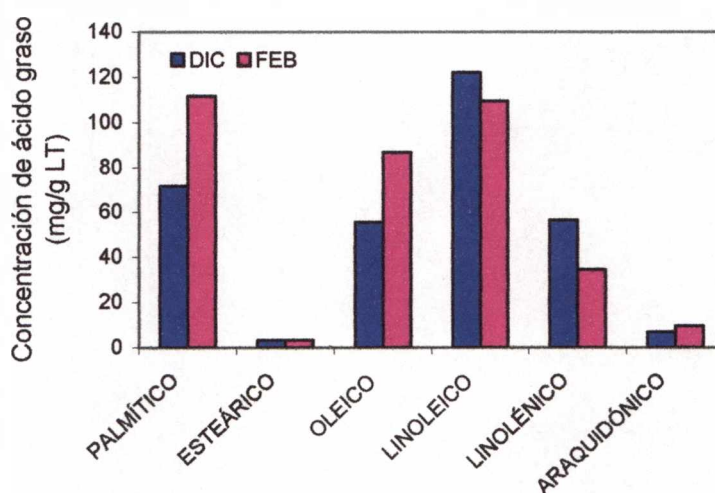


Figura IV.1. Composición de ácidos grasos de berenjenas cv. Black nite correspondiente a diferentes fechas de recolección. $LSD_{0,05}$ (Palmítico) = 5,43. $LSD_{0,05}$ (Estearico) = 0,05; $LSD_{0,05}$ (Oleico) = 6,40; $LSD_{0,05}$ (Linoleico) = 18,53; $LSD_{0,05}$ (Linolénico) = 9,91; $LSD_{0,05}$ (Araquidónico) = 2,18.

En la Figura IV.1 se observa un incremento en la concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (palmítico, oleico y araquidónico) y una disminución en la cantidad de ácido linolénico de los frutos desarrollados a mayor temperatura. Los ácidos palmítico y oleico de las berenjenas cosechadas en febrero superaron en más de un 50% a las concentraciones encontradas en los frutos cosechados en diciembre. Asimismo, se registró un porcentaje mayor al 60% en la disminución en el contenido de ácido linolénico. Los ácidos esteáricos y linoleico no mostraron variaciones y el ácido araquidónico presentó un incremento del 34%.

Condiciones diferentes de niveles de luz, radiación ultravioleta y temperatura durante el crecimiento de pimientos cv. Gator Bell, cultivados en invernadero y a campo, mostraron cambios en la composición de los lípidos de plástidos y microsomas siendo los más importante las proporciones relativas de esteroides libres, esterilglicósidos y esterilglicósidos acilados así como la relación esterilípidos : fosfolípidos que registraron aumentos en los microsomas y disminución en los plástidos durante la maduración de los frutos. Variaciones mucho más marcadas de estas tendencias se observaron en los pimientos cultivados a campo. Estas observaciones indujeron a su autor (Whitaker, 1991b) a plantear la necesidad de realizar estudios sobre el efecto de las condiciones de crecimiento de los frutos en la composición de los lípidos de membrana.

La alteración en la composición de lípidos de membrana de microorganismos, necesaria para mantener su fluidez, ha sido estudiada por numerosos autores a diferentes temperaturas de crecimiento. Así, por ejemplo, ensayos realizados con la cianobacteria marina unicelular *Synechococcus* sp. PCC 7002 revelaron un incremento en el grado de insaturación de ácidos grasos de 18 átomos de carbono en células que crecieron a 22°C comparadas con las que se desarrollaron a 38°C (Sakamoto y col., 1997).

Por otra parte, Larkindale y Huang (2004) investigaron los cambios en la composición de lípidos de membrana y sus niveles de saturación en tejidos foliares y radiculares de tres cultivares de *Agrostis stolonifera*, una hierba rastrera, sometidas a una aclimatación a alta temperatura y estrés térmico (28 días a 35°C en cámara de crecimiento). Verificaron un incremento en el nivel de saturación de los lípidos en el extracto lipídico total proveniente de las hojas sometidas a estrés debido a una disminución del ácido linolénico y un incremento de los ácidos linoleico y palmítico.

Norman y col. (2001) sugirieron la habilidad de cultivares de *coleus* para adaptarse a las bajas temperaturas de crecimiento, alterando la composición de los lípidos de membrana, al observar un incremento en el grado de insaturación en respuesta a la reducción de la temperatura de 20°C a 13°C debido al aumento de las especies moleculares que contenían ácido linolénico.

La evolución del contenido de los principales ácidos grasos determinados en las berenjenas conservadas a 3°C, almacenadas a 3°C y transferidas a 20°C y mantenidas a 20°C se observa en la Figura IV.2.

Los ácidos palmítico y oleico no mostraron diferencias significativas durante las primeras horas de almacenamiento refrigerado. A los 3 días se incrementaron sus concentraciones en, aproximadamente, un 83% y 76% respectivamente. Al aumentar el período de conservación, ambos ácidos grasos disminuyeron en el tiempo siendo más marcada la pérdida del ácido oleico.

En los frutos almacenados a 20°C, el contenido del ácido palmítico fue siempre menor y mostró un comportamiento similar al de las berenjenas almacenadas a 3°C para períodos de conservación superiores a los 3 días. Durante la transferencia de los frutos a 20°C por 48 horas los valores obtenidos también fueron significativamente menores.

La evolución de la concentración de ácido oleico presentó, asimismo, una tendencia decreciente menos marcada durante el almacenamiento a 20°C obteniéndose valores superiores al cabo de 12 días de conservación. En tanto, el pasaje a 20°C sólo registró valores inferiores a los 3 días, no se registraron diferencias significativa a los 6 y 9 días y aumentó a los 12 días al comparar su evolución con los frutos almacenados a 3°C.

El ácido araquidónico no presentó diferencias hasta los 6 días de almacenamiento tanto a 3°C como a 20°C. Sólo se registró un incremento a los 9 y 12 días en los frutos conservados a 3°C (datos no mostrados).

Los ácidos grasos poliinsaturados disminuyeron hasta los 2 días de almacenamiento a 3°C para registrar un incremento muy marcado al cabo de 3 días. El ácido linoleico aumentó más de 2,2 veces mientras que el linolénico sólo registró un aumento ligeramente superior al 60% con respecto a su concentración inicial. A los 6 días de conservación, ambos ácidos grasos disminuyeron para permanecer sin variaciones significativas durante el resto del almacenamiento.

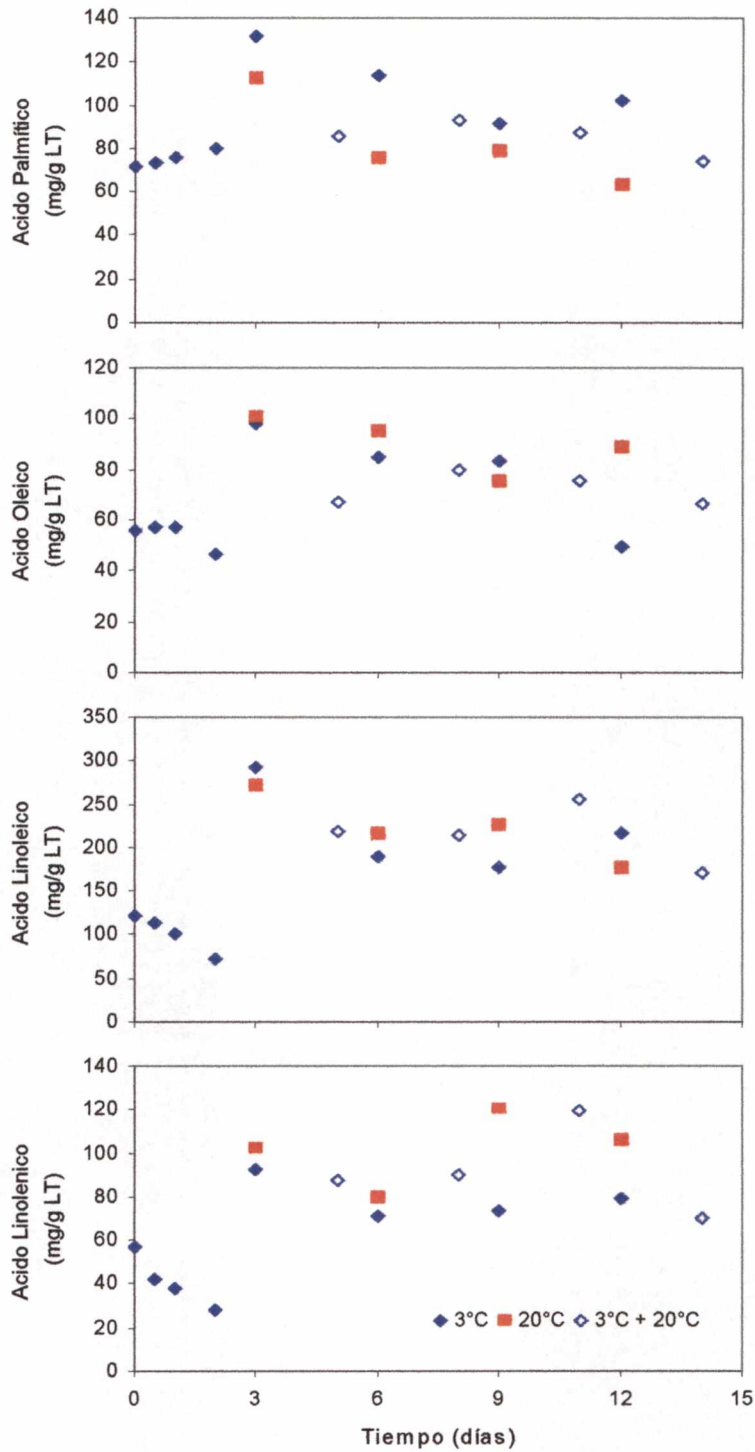


Figura IV.2. Evolución de los principales ácidos grasos de berenjenas Black nite durante el almacenamiento refrigerado, a 20°C y almacenadas a 3°C + 20°C por 48 horas. $LSD_{0,05}$ (Palmítico) = 7,31; $LSD_{0,05}$ (Oleico) = 13,77; $LSD_{0,05}$ (Linoleico) = 18,13; $LSD_{0,05}$ (Linolénico) = 9,76.

A 20°C, estos ácidos poliinsaturados también se incrementaron a los 3 días sin mostrar diferencias significativas con los frutos almacenados a 3°C. A mayores tiempos de conservación, el ácido linoleico disminuyó más lentamente alcanzando valores menores recién a los 12 días. El ácido linolénico, sin embargo, registró otro incremento importante a los 9 días manteniéndose siempre sus niveles por encima del de las berenjenas conservadas a 3°C. Un comportamiento similar se evidenció en los frutos luego del pasaje a 20°C.

El particular comportamiento de los ácidos grasos determinados a los 3 días de almacenamiento, momento en el que comienza a manifestarse el daño por frío, coincidió con una disminución en el contenido de lípidos totales de los frutos analizados. Sin embargo, al referir sus contenidos en base a los gramos de tejido fresco, las tendencias observadas fueron similares a las antes descritas.

Estas observaciones concuerdan con las indicadas por Stanley (1991) quién mencionó la existencia de evidencia que demuestra que el estrés por bajas temperaturas ocasiona una síntesis de cantidades mayores de ácidos grasos insaturados para permitir mantener la fluidez de la membrana. Asimismo, Sinensky (1974) informó el incremento en la síntesis de ácidos grasos insaturados, para éste mismo propósito, en *Escherichia coli* sometida a bajas temperaturas denominando al fenómeno "aclimatación homeoviscosa".

Por otra parte, Zhuang y col. (1994) registraron una disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de floretes de brócoli cv. Iron Duke almacenados durante 6 días a 5°C atribuyendo dicha disminución a la pérdida de ácido linolénico debida a la senescencia del tejido. No encontraron diferencias significativas en los ácidos grasos saturados y el ácido oleico aumentó a las 24 horas permaneciendo sin variaciones al cabo de 6 días de conservación. En otro estudio, realizado con el mismo producto, Zhuang y col. (1997) no encontraron diferencias significativas en los ácidos grasos de floretes almacenados a 2°C durante un almacenamiento de 144 horas. Sin embargo, el aumento de la temperatura (13°C y 23°C) causó una disminución en su contenido, disminuyendo también los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados luego de 144 horas de conservación. Las

muestras almacenadas a 2°C registraron niveles significativamente más altos de ácidos saturados y poliinsaturados. Atribuyeron la disminución de ácidos grasos totales a las pérdidas antes mencionadas con más del 80% de la pérdida debida al menor contenido de poliinsaturados.

Si bien Mazliak (1987) adjudicó la rápida pérdida de lípidos, especialmente lípidos de membrana, al deterioro de tejidos vegetales, Whitaker (1991b) determinó que el contenido de ácidos grasos libres de tomates cv. Rutgers, almacenados a 15°C, aumentaba gradualmente durante los primeros 4 días de almacenamiento, bruscamente entre los 4 y 8 días y no variaba durante los 4 días finales. La suma de ácidos linoleico y linolénico mostraron la misma tendencia. Por el contrario, en los frutos mantenidos a 2°C, el contenido de ácidos grasos libres disminuyó los 2 primeros días, aumentando ligeramente entre el día 2 y 4, más rápidamente entre el 4 y 8 y se estabilizaron entre los 8 y 12 días. A los 8 días de conservación, cuando el contenido de ácidos grasos libres fue máximo tanto en la fruta enfriada como en la no enfriada, la cantidad de ácidos linoleico y linolénico fue tres veces mayor en la fruta mantenida a mayor temperatura. Atribuyó el incremento de los ácidos grasos libres de los frutos a 15°C a la hidrólisis de lípidos tilacoides durante la transformación de plástidos.

Por otra parte, Bergevin y col. (1993), al estudiar el efecto del daño por frío en tomates cv. Caruso almacenados durante 18 y 22 días a 1 y 20°C, encontraron que la proporción de ácido linolénico en los lípidos totales disminuía a 20°C. El porcentaje de palmítico y, especialmente, oleico se incrementaba durante la maduración y la proporción de ácido linolénico aumentaba durante el almacenamiento a 1°C mientras que la proporción de oleico y linoleico disminuía. Cuando los frutos eran transferidos a 20°C por 4 días, después de 18 días de refrigeración, el porcentaje de linolénico decreció, observándose un incremento en la proporción de palmítico y oleico.

IV . 4.2. Fosfolípidos

La Figura IV.3 muestra la variación en el tiempo de los fosfolípidos de berenjenas durante las condiciones ensayadas. Tal como puede observarse en la misma, durante el almacenamiento a 3°C se registró una disminución a tiempos cortos seguido de un aumento paulatino hasta los 6 días de conservación y registrándose una nueva disminución a los 9 días a partir de los cuales permanecieron sin cambio significativo a niveles inferiores a los iniciales. En las berenjenas mantenidas a 20°C, a los 9 días se manifestó un incremento superior al 80% con respecto al valor inicial sin producirse modificaciones para tiempos menores a los 6 días. El pasaje, en general, arrojó valores mayores al de los frutos refrigerados y similares a los correspondientes a 20°C a los 3 y 6 días, sin manifestarse variaciones en el tiempo de conservación.

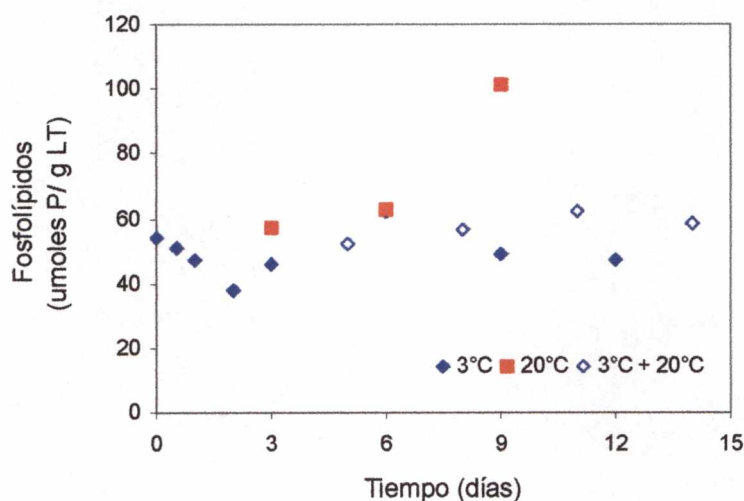


Figura IV.3. Modificación de fosfolípidos de berenjenas Black nite durante el almacenamiento refrigerado, a 20°C y transferidas a 20°C por 48 horas. $LSD_{0,05} = 7,58$.

Se ha demostrado que el frío induce la degradación de lípidos en pepinos (Parkin y Kuo, 1989), plantas semilleras de pepinos (Whitaker y Wang, 1987) y pericarpio de tomate (Nguyen y Mazliak, 1990).

Así, Whitaker (1991a) encontró que el contenido de fosfolípidos de pericarpio de tomates cv Rutgers, almacenados a 15°C y 2°C, disminuía sólo ligeramente luego de 12 días de almacenamiento a ambas temperaturas. Asimismo, en otra experiencia (Whitaker, 1993), trabajando con tomates cv. Pik Red en las mismas condiciones anteriores, encontró que los fosfolípidos de los plástidos y microsomas de membrana del pericarpio descendían. Al experimentar con los mismos tomates (Whitaker, 1994), almacenados a 2°C y 20°C, también notó que el contenido de fosfolípidos totales disminuía durante la maduración (14 días a 20°C) pero no cambiaban apreciablemente durante el enfriamiento o después de 21 días a 2°C seguidos de un acondicionamiento de 4 días a 20°C.

Igualmente, Bergevin y col. (1993) al investigar sobre el efecto del daño por frío en tomates cv. Caruso almacenados a 1°C y 20°C, encontraron que el contenido de fosfolípidos decrecía al cabo de 18 y 22 días de almacenamiento a 20°C pero permanecía constante durante el almacenamiento a 1°C y después de un pasaje de 4 días a 20°C luego de 18 días de exposición a bajas temperaturas.

Wang y col. (1992), trabajando con zuchinis cv. Ambassador almacenados 5°C, determinaron que los fosfolípidos predominantes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) disminuyeron continuamente durante el almacenamiento al igual que fosfatidilinositol y fosfatidilglicerol.

Sin embargo, Whitaker (1992) investigando la evolución de fosfolípidos en tomate cv. Rutgers de diferentes estados de maduración y almacenados a 2°C y 15°C, encontró que, en ambos casos, el contenido de fosfolípidos se incrementaba en un 7-11% después de 4 días de almacenamiento a 2°C, manteniéndose, al cabo de 12 días, en niveles aún superiores del orden de 4-7%. Por el contrario, después de 4 días a 15°C el contenido de fosfolípidos disminuyó continuando esta tendencia, pero en menor magnitud, al cabo de 12 días en los frutos verde maduros y aumentó ligeramente en los verde maduro (7-10%).

No obstante, Whitaker (1995) encontró resultados diferentes al estudiar la variación de fosfolípidos en pimientos cv. Bell Tower almacenados a 2°C

durante 14 días. Encontró una ligera disminución de los mismos y un incremento sustancial después del pasaje por 3 días a 20°C.

IV . 4.3. Peroxidación

La peroxidación lipídica es un grupo extremadamente complejo de etapas enzimáticas y no enzimáticas, que ocurren tanto simultánea como competitivamente, y origina una gran variedad de compuestos intermediarios y finales (Stanley, 1991).

En la Figura IV.4 se representa la evolución del contenido de malondialdehído (MDA) y monoaldehídos (MA) obtenida en nuestras experiencias.

En ambas gráficas se observa un comportamiento similar hasta los 6 días de almacenamiento a 3°C. A partir del segundo día de refrigeración, y antes de manifestarse signos visibles del daño por frío, comienzan a incrementarse hasta alcanzar valores máximos siendo el contenido de MDA, aproximadamente, 2,8 superior al valor inicial mientras que el contenido de MA arrojó un incremento aproximado de 2,1 veces el valor inicial. A los 9 días de conservación ambos disminuyeron permaneciendo sin variaciones hasta el final del almacenamiento presentándose una reducción más marcada en el contenido de MDA.

Durante el almacenamiento a 20°C, el comportamiento fue similar hasta los 6 días de conservación alcanzándose los valores máximos en ambos casos. Sin embargo, los incrementos registrados fueron menores al de los frutos almacenados a 3°C siendo, aproximadamente, un 70% superior el contenido de MA y un 125% el contenido de MDA con respecto a los valores iniciales. A los 9 días de mantenimiento a 20°C, se registró una disminución tanto en el contenido de MDA como de MA. En el primer caso, esta tendencia continuó hasta el final del período de conservación alcanzándose valores inferiores a los iniciales al cabo de 12 días mientras que el contenido de MA permaneció sin variaciones significativas.

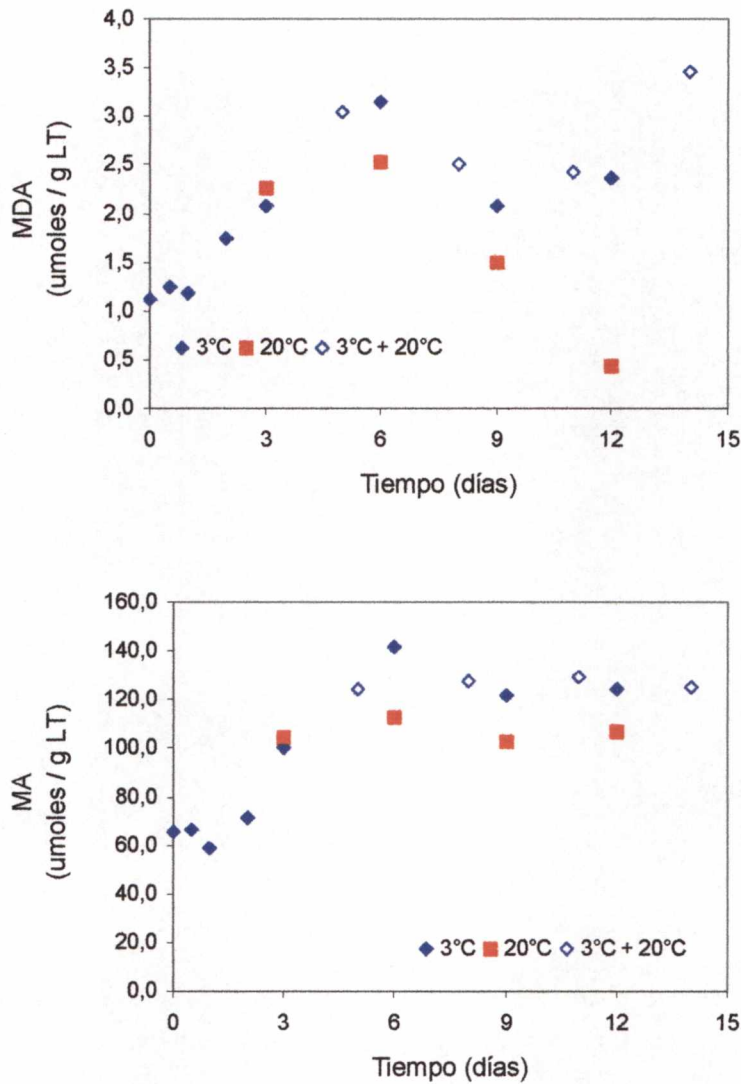


Figura IV.4. Variación del contenido de malondialdehído y monoaldehídos de berenjenas Black nite durante el almacenamiento refrigerado, a 20°C y transferidas a 20°C por 48 horas. $LSD_{0,05}$ (MDA) = 0,47; $LSD_{0,05}$ (MA) = 7,65.

Los frutos transferidos a 20°C mostraron valores significativamente mayores comparados con los frutos almacenados a 3°C luego de 3 días y valores menores a los 6 días, en ambos casos. El contenido de MDA registró un nuevo incremento luego del pasaje a los 12 días mientras que el contenido de MA permaneció sin variación.

Kuo y Parkin (1989) no encontraron variaciones en el nivel de peroxidación de ácido linoleico en pepinos cv. Carolina almacenados a 14°C,

medida a través del etano producido. Sin embargo, durante su almacenamiento a 4°C observaron que la evolución de etano comenzó a los 12-13 días incrementándose su producción en los frutos transferidos a 14°C recién luego de 7 días de almacenamiento en frío. A partir de estas observaciones, concluyeron que la peroxidación lipídica inducida por el frío ocurre antes del daño irreversible tanto en frutos enfriados como en los transferidos a mayor temperatura. Por otra parte, dicha peroxidación fue potenciada antes de cualquier evidencia de daño concordando con la observación de que se requieren varios días de exposición al frío para impartir un daño irreversible a tejidos vegetales sensibles al frío.

No obstante, Zhuang y col. (1997) encontraron un marcado incremento en el contenido de MDA y MA en floretes de brócoli cv. Iron Duke almacenados a 23°C mientras que a 13°C sólo observaron diferencias al final del almacenamiento (144 horas) no percibiendo diferencias en las primeras 48 horas de conservación.

Asimismo, Meir y col. (1992), a partir del concepto de que la peroxidación lipídica juega un rol significativo en la senescencia de hojas, estudiaron la evolución de ésta durante la conservación de perejil. Para ello, almacenaron las hojas durante 7 días a 25°C y encontraron un incremento tanto en MDA como en MA a partir del 4° día concluyendo que los modos de acumulación de MA durante la senescencia de perejil eran similares a los de MDA. Resultados similares encontraron Zhuang y col. (1994) en brócoli.

Puesto que la senescencia se caracteriza por la peroxidación lipídica (frutos almacenados a 20°C), los patrones similares de oxidación encontrados durante el daño por frío indican que existe una relación entre estos dos procesos por lo que podría suponerse que el daño por frío es una forma de senescencia inducida tal como fue sugerido por Stanley (1991).

IV . 5. CONCLUSIONES

- Los principales ácidos grasos que se detectaron en las berenjenas Black nite fueron palmítico, oleico, linoleico y linolénico.
- El perfil de ácidos grasos se vio influenciado por la temperatura de crecimiento de los frutos siendo mayor la concentración de ácidos saturados y monoinsaturados y menor la de ácido linolénico de los frutos desarrollados a mayor temperatura.
- Los ácidos palmítico y oleico registraron un incremento a los 3 días de almacenamiento refrigerado disminuyendo sus concentraciones para períodos de conservación mayores. Un comportamiento similar se registró en los frutos almacenados a 20°C.
- Se registró un marcado incremento en los ácidos grasos poliinsaturados luego de 3 días de almacenamiento a 3°C, similar al de los frutos almacenados a 20°C, disminuyendo a los 6 días y permaneciendo sin variaciones durante el resto del almacenamiento.
- La disminución de la concentración de ácidos grasos saturados fue más marcada en los frutos almacenados a 20°C que a 3°C registrándose una reducción menos marcada en los ácidos grasos insaturados. Similar comportamiento se observó en los frutos luego del pasaje a 20°C por 48 horas.
- La concentración de fosfolípidos presentó una disminución para tiempos cortos de almacenamiento a 3°C seguido de un paulatino ascenso y posterior disminución a los 9 días. El pasaje, en general, arrojó valores mayores al de los frutos refrigerados y similares a los correspondientes a 20°C.

- El grado de peroxidación de los lípidos aumentó antes de manifestarse signos visibles de daño por frío en los frutos almacenados a 3°C alcanzándose valores máximos a los 6 días de conservación.
- Los frutos transferidos a 20°C mostraron un comportamiento parecido al de los frutos almacenados a 3°C.
- El nivel de peroxidación de las berenjenas almacenados a 20°C fue menor al de los frutos almacenados a 3°C.

CAPÍTULO V

APLICACIÓN DE ATMÓSFERA MODIFICADA PARA REDUCIR LA INCIDENCIA DEL DAÑO POR FRÍO

V . 1. INTRODUCCIÓN

Se estima la magnitud de las pérdidas postcosecha en frutas y vegetales frescos en un 5-25% en países desarrollados y en un 20-50% en países en desarrollo, dependiendo del cultivar del producto y de las condiciones de manejo (Kader, 2002a).

Por ello, el papel último de la tecnología poscosecha es idear métodos por los cuales la deterioración del producto esté lo más restringida posible durante el período entre el productor y el consumidor final. Esto requiere una completa comprensión de la estructura, composición, bioquímica y fisiología de los productos hortícolas ya que las tecnologías postcosecha estarán principalmente relacionadas con la reducción de la velocidad metabólica del producto sin inducir eventos anormales (Wills y col., 1998).

La temperatura juega un rol fundamental en el metabolismo de las frutas y hortalizas. La disminución de la temperatura reduce el metabolismo y, por lo tanto, prolonga la vida útil. Si bien la refrigeración es una de las principales técnicas utilizadas para mantener la calidad de los vegetales, desafortunadamente, algunos tejidos son sensibles a las bajas temperaturas (Marangoni y col., 1996).

Los productos frescos sensibles al frío no pueden obtener la ventaja completa del almacenamiento refrigerado pero si no se refrigeran se deterioran rápidamente. Si pudiera aumentarse la tolerancia al frío de estos tejidos sensibles, o si la evolución de los síntomas del daño por frío pudiera retardarse, entonces sería factible conservarlos a temperaturas más bajas a fin de reducir la velocidad de deterioro (Wang, 1993).

V . 1.1. TRATAMIENTOS POSTCOSECHA PARA REDUCIR LA INCIDENCIA DEL DAÑO POR FRÍO

Numerosos trabajos se ha publicado relacionados con las diferentes técnicas que pueden usarse durante el período postcosecha para disminuir este daño. Estas técnicas pueden clasificarse en tratamientos térmicos,

calentamiento intermitente, atmósfera controlada, aplicación de reguladores de crecimiento, otros tratamiento químicos, encerado y otros recubrimientos y empacado. Las tres primeras manipulan y modifican el ambiente de almacenamiento mientras que las otras involucran el tratamiento directo de los productos. Algunas de estas tecnologías son más efectivas en ciertos productos que en otros y las condiciones óptimas varían con los diferentes vegetales (Wang, 1993).

La gran variabilidad de los vegetales en cuanto a forma, tamaño y fisiologías así como las diferencias existentes entre cultivares y especies influyen en su susceptibilidad al daño por frío por lo que no existe un método universal para disminuir este daño. Esto hace que las condiciones de tratamiento ensayadas por los diferentes investigadores sean específicas para ese producto en particular.

A continuación se presentan de manera sucinta estas técnicas incluyéndose algunos ejemplos de aplicación y tratamientos probados en berenjena, cuando corresponda.

a) Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos se realizan para controlar insectos y prevenir putrefacciones fúngicas. Asimismo, afectan la maduración o respuesta a temperaturas extremas de los productos (Lurie, 1998). Estos tratamientos se clasifican, teniendo en cuenta de la magnitud de las temperaturas utilizadas, en:

a.1) Acondicionamiento a bajas temperaturas

Temperaturas previas al almacenamiento ligeramente por encima del rango crítico aumentan la tolerancia al frío de los vegetales durante la conservación posterior a baja temperatura y retrasa el desarrollo de los síntomas de daño (Wang, 1993).

Como ejemplo podemos citar el acondicionamiento de zuchini a 10°C o a 15°C durante 2 días previos a su almacenamiento a 5°C (Wang, 1995a; Wang, 1995b; Wang, 1996; Kramer y Wang, 1990).

El acondicionamiento a dos temperaturas, en etapas, es aún más efectivo que el acondicionamiento a una temperatura. Así por ejemplo, tomates pueden aclimatarse al almacenamiento a bajas temperaturas por la exposición sucesiva durante 4 días a 12°C seguida de 4 días a 8°C y 7 días a 5°C (Marangoni y col., 1990). Asimismo, Nakamura y col. (1985) recomendaron el acondicionamiento previo de berenjenas almacenadas a 6,5°C que consistió en someterlas a 15°C por 1-2 días seguido de 1 día a 10°C.

Aparentemente estos acondicionamientos inducen modificaciones fisiológicas que, dependiendo del vegetal, son: incrementos en las concentraciones de aldehydos de cadenas largas; incrementos en azúcar y almidón; disminución de ARN, proteínas y fosfatos liposolubles; disminución de la pérdida de clorofila; reducción de la pérdida de lípidos; incremento en el grado de instauración de los ácidos grasos de los fosfolípidos relacionados con la flexibilidad de la membrana; incrementos en los niveles de ácido linoleico; incrementos significativos de poliaminas; etc. (Wang, 1993).

a.2) Acondicionamiento a altas temperaturas

Consiste en tratamientos a temperaturas más altas que en el caso anterior pero subletales, generalmente inferiores a 40° - 50°C. Estos calentamientos se pueden realizar utilizando agua caliente, aire saturado con vapor de agua o aire caliente.

En este caso, la reducción de la sensibilidad al daño por frío de las frutas está relacionado con la acumulación de proteínas de shock térmico (HSP) y modificaciones en la composición de lípidos que imprimen una mayor fluidez a las membranas (Lurie, 1998).

Por ejemplo, el tratamiento térmico de tomates durante 2-3 días en aire a 38°C reduce su sensibilidad a la baja temperatura y pueden ser almacenados durante más de un mes a 2°C sin desarrollar daño por frío (Sabehat y col.,

1996; Lurie y Sabehat, 1997). Asimismo, la inmersión de tomates en agua a 46-48°C durante 2-3 min provoca la adaptación del tejido a la baja temperatura (2°C) (Lurie y col., 1997).

Tratamiento con aire a 35°C durante 1 hora redujeron la incidencia del daño por frío en berenjenas cv. Black nite (Rodríguez, 2000) al igual que tratamientos con aire a 40°C por 2 horas en berenjenas cv. Money Maker N°2 (Concellón, 2003). En ambos casos los frutos fueron almacenados en atmósfera modificada después de los tratamientos.

b) Calentamiento intermitente

La interrupción de la refrigeración por uno o más períodos cortos de exposición a temperaturas templadas incrementa la vida de almacenamiento de algunos productos sensibles al frío si se realiza antes de que el daño sea irreversible (Wang, 1993). El efecto benéfico de este calentamiento parece residir en la recuperación de los efectos perjudiciales del estrés (eliminación de sustancias tóxicas o inhibidoras, reparación del daño de membranas, organelas o rutas metabólicas, etc.), si bien el efecto de recuperación puede confundirse con la maduración que también ocurre a temperaturas más altas (Wade, 1979; Wang, 1993).

c) Atmósferas controladas (AC)

Las atmósferas controladas consisten en modificar deliberadamente la concentración de oxígeno y/o dióxido de carbono del ambiente que rodea al producto. Precisamente, la disminución de la concentración de oxígeno y/o el aumento de la concentración de dióxido de carbono, en relación a la composición del aire, se usan para retrasar la maduración y la senescencia en productos frescos usualmente en conjunto con el almacenamiento refrigerado. Sin embargo, dependiendo del producto, la atmósfera puede ser beneficiosa, ir en detrimento o no tener efecto en la reducción del daño por frío.

Un ejemplo de almacenamiento en AC beneficiosa es la conservación a 4°C de pimientos con mezclas de 1% CO₂ + 1% O₂ y 3% CO₂ + 1% O₂. Ambas reducen el daño por frío (Yang y Lee, 1997).

En recientes años se han realizado varios refinamientos del almacenamiento en AC para mejorar el mantenimiento de la calidad. Éstos incluyen la producción de nitrógeno por separación del aire comprimido usando tamices moleculares o sistemas de membranas; el almacenamiento a bajas concentraciones de O₂ (1,0-1,5%); AC bajas en etileno; AC rápidas (establecimiento rápido de los niveles óptimos de O₂ y CO₂); y, almacenamiento en AC programada o secuencial (por ejemplo, almacenamiento en 1% de O₂ por 2 a 6 semanas seguido del almacenamiento en 2 a 3% de O₂ durante el resto del periodo de conservación) (Kader, 2002a)

d) Aplicación de reguladores de crecimiento

Las aplicaciones exógenas de reguladores de crecimiento incrementan la tolerancia de los tejidos al daño por frío ya que influyen en un amplio rango de procesos bioquímicos y fisiológicos. Entre ellos podemos mencionar ácido absísico, triazoles, etileno, poliaminas y ácido jasmónico y su derivado metilado (Wang, 1993; Concellón, 2003).

El ácido absísico (ABA) estabiliza la red microtubular cuya depolimerización está involucrada en el daño por frío, inhibe la pérdida de glutathion reducido, actúa como agente antitranspirante y estabilizador de la membrana e induce la síntesis proteica (Wang, 1993). Tratamientos directos de zuchinis con ABA exógeno antes de su almacenamiento a 2,5°C incrementó los niveles de ABA en el tejido y fueron efectivos en reducir el daño por frío (Wang, 1991).

Muchas de las respuestas fisiológicas a los jasmonatos son similares a los efectos causados por el ABA y su efectividad en el retraso del daño por frío ha sido comprobada en zuchini (Wang y Buta, 1994) y berenjenas (Concellón, 2003), entre otros.

Los triazoles retrasan la degradación de los lípidos de membranas, previenen la pérdida de fosfolípidos, aumentan los niveles de antioxidantes liposolubles, α -tocoferol y ácido ascórbico en hojas, protegen los componentes de las membranas del daño oxidativo y la peroxidación lipídica incrementando los mecanismos de defensa de los tejidos contra los radicales libres e inhiben la síntesis de ácido giberélico, entre otros efectos (Wang, 1993).

El etileno incrementa el grado de maduración y algunos productos como tomates y papaya disminuyen su susceptibilidad al daño por frío. Sin embargo, en otros como palta aumenta su susceptibilidad cuanto más madura está y en otros el etileno no tiene efectos como en limones (Wang, 1993).

El incremento en niveles de poliaminas o la aplicación de poliaminas exógenas está relacionado con su actividad antioxidante y su efecto estabilizador de membranas (Wang, 1993).

e) Tratamientos químicos

Estos incluyen calcio, aceites vegetales o minerales, diferentes funguicidas (tiabendazol, benomil, imazalil) y algunos antioxidantes y atrapadores de radicales libres (etoxiquin, benzoato de sodio, dimetilpolisilozano, butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, escualeno, difeniamina). Su acción radica en retardar los eventos secundarios causados por el daño por frío tales como la supresión de los procesos oxidativos, incremento de la relación entre ácidos grasos insaturados y saturados o reducir la pérdida de humedad (Wang, 1993).

Tratamientos con difenilamina de pimientos verdes reducen el punteado superficial, síntoma de daño por frío en este producto, durante su almacenamiento a 1°C durante 6 días (Purvis, 2002).

f) Encerado y otros recubrimientos

El encerado de frutas y vegetales restringe el intercambio gaseoso y la transpiración de los productos frescos y, por lo tanto, tiene un efecto similar al recubrimiento con películas plásticas.

Los dos tipos de productos utilizados más comúnmente son ceras a base de aceites minerales y ceras naturales como la carnauba. Ambas pueden aplicarse como emulsiones acuosas o con un solvente. Si bien reducen la velocidad de pérdida de peso en más de un tercio, aproximadamente, al reducir el intercambio gaseoso del producto pueden interferir con la respiración aeróbica normal (Thompson y col., 2002).

g) Empacado con películas plásticas o atmósferas modificadas (AM)

El empacado de frutas y vegetales con películas plásticas ayuda a mantener una alta humedad relativa y modifica las concentraciones de O₂ y CO₂ en la atmósfera que rodea el producto.

El recubrimiento con películas de polietileno de bananas cv. Giant, para extender la vida útil, mantiene su condición de comercialización por más de 28 días después de la cosecha (Sarkar y col., 1997). El recubrimiento de mangos acondicionados en cajas de cartón corrugado recubiertas con polietileno microperforado o Xtend® reducen el síntoma de aparición de manchas lenticelares rojas (Pesis y col., 2000). Asimismo, el recubrimiento de pepinos con películas de polietileno de baja densidad fue efectivo para retrasar y disminuir la incidencia del daño por frío durante su conservación a 5°C (Wang y Qi, 1997).

V . 1.2. ATMÓSFERAS MODIFICADAS

El término atmósfera modificada o atmósfera controlada (AM ó AC) implica la adición o remoción de gases resultando en una composición atmosférica diferente de la del aire normal. Ambos almacenamientos se refieren a concentraciones reducidas de O₂ e incrementadas de CO₂ (Wills y col., 1998).

La única diferencia entre AC y AM está en que en AC la concentración de los distintos gases se monitorea regularmente y se mantiene dentro de los estrechos límites prefijados, mientras que en AM la concentración final de los gases es estimada y no se monitorea ni se interviene a lo largo del tiempo para modificar o corregir la atmósfera (Del Valle y Palma, 1997). En el empaquetado con películas plásticas el cambio en la composición de la atmósfera puede realizarse intencionalmente o no.

El beneficio potencial o el riesgo de usar AM depende del producto, cultivar o variedad, edad fisiológica, composición atmosférica y temperatura y duración del almacenamiento. Esto ayuda a explicar la gran variabilidad en los resultados publicados para el uso de esta tecnología en un producto determinado (Kader, 2002b)

V . 1.3. BENEFICIOS Y RIESGOS POTENCIALES DE LAS ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Kader (2002b) expresa que, usadas adecuadamente, las AC o AM pueden complementar el manejo de temperatura adecuada y pueden resultar en uno o más de los siguientes beneficios, que se traducen en una disminución de las pérdidas cuantitativas o cualitativa durante el manejo y almacenamiento postcosecha de algunos productos hortícolas:

- Se produce el retraso de la senescencia (maduración) conjuntamente con los cambios bioquímicos y fisiológicos asociados, por ejemplo disminución en las velocidades de respiración y producción de etileno, ablandamiento y cambios composicionales.
- Se origina una reducción de la sensibilidad de la fruta a la acción del etileno a niveles de O₂ inferiores al 8% o niveles de CO₂ superiores al 1%, aproximadamente, o sus combinaciones.
- Pueden verificarse atenuaciones de ciertos desórdenes fisiológicos, tales como el daño por frío en diversos productos, el manchado en

lechugas y algunos desórdenes de almacenamiento como escaldaduras en manzanas.

- Las atmósferas modificadas pueden afectar, directa o indirectamente, a los patógenos de postcosecha y, consecuentemente, disminuir su incidencia y severidad. Por ejemplo, niveles elevados de CO₂ (10 a 15%) inhibe significativamente el desarrollo de Botrytis en frutillas, cerezas y otras frutas.
- La modificación de la atmósfera (menos del 1% de O₂ ó 40-60% de CO₂) puede ser una herramienta útil para el control de insectos en algunos productos.

Sin embargo, en muchos casos, la diferencia entre los beneficios y perjuicios de la AM es relativamente pequeña. También, por ejemplo, las AM necesarias para controlar el decaimiento o los insectos pueden no ser siempre toleradas por el producto y resultar en un deterioro más rápido. Es así que, entre los riesgos potenciales Kader (2002b) menciona:

- Iniciación o agravamiento de ciertos desórdenes fisiológicos como el corazón negro en papas, la aparición de marchas pardas en lechuga y el corazón pardo en manzanas y peras.
- Maduración irregular en frutas tales como banana, mango, pera y tomate si se exponen a niveles de O₂ inferiores al 2% o niveles de CO₂ superiores al 5% por más de 2 a 4 semanas.
- Desarrollo de sabores y olores no característicos con concentraciones muy altas de CO₂ o muy bajas de O₂ como consecuencia de la respiración anaeróbica o el metabolismo fermentativo.
- Incremento en la susceptibilidad al deterioro cuando el producto es dañado fisiológicamente por concentraciones muy bajas de O₂ o muy altas de CO₂.
- Estimulación de la brotación o retardo en el desarrollo del peridermo en algunas raíces y tubérculos tales como papas.

Por otra parte, el uso de la tecnología de empaçado en atmósfera modificada presenta ventajas y desventajas tanto desde el punto de vista del consumidor como del procesador. Phillips (1996) resume estos aspectos, en función de la información proporcionada por Davies (1995), en la siguiente Tabla:

	Para el consumidor	Para el procesador
Ventajas	Incremento de la vida útil	
	Producto de alta calidad	Empacado centralizado
	Preparación más fácil de tajadas	Reducción de los costos de distribución (menores entregas para distancias más largas)
	Vista clara del producto	
Desventajas	Costo agregado	
	Requiere control de temperatura	
	Seguridad del producto a establecer	
	Incremento en las necesidades de espacio y en los costos de transporte por el incremento de volumen del envase	
	Los beneficios se pierden una vez abierto el envase	entrenamiento especializado y equipamiento necesario
	Cada producto requiere diferentes formulaciones gaseosas	

Extraído de Davies (1995).

V . 1.4. TIPOS DE ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Las atmósferas modificadas pueden generarse de manera activa (AMA) si se altera su composición intencionalmente o de manera pasiva (AMP) si dicha modificación resulta como consecuencia de la respiración del producto.

En las AMP o generada por el producto la composición de la atmósfera en contacto con el alimento (en el interior de un recipiente cerrado) se modifica, principalmente, por efecto del consumo de O₂ y la liberación de CO₂ asociados a su respiración.

A fin de alcanzar y mantener una atmósfera satisfactoria en el interior del envase, las permeabilidades de la película sellada deben ser tales que permita la entrada de O₂ en el recipiente a una velocidad que compense el consumo de O₂ por el producto. Similarmente, el CO₂ debe ser eliminado en proporción a su velocidad de producción. Sin embargo, esta atmósfera debe ser estabilizada rápidamente y sin peligro de creación de condiciones de anoxia o altos niveles perjudiciales de CO₂ (Kader, 2002b).

Alternativamente, la atmósfera del envase se puede alterar activamente (AMA) realizando un ligero vacío e introduciendo en el envase la mezcla deseada de gases.

A pesar de que la modificación activa implica algunos costos adicionales, su principal ventaja radica en que se asegura el rápido establecimiento de la atmósfera deseada. Por otra parte, las mezclas utilizadas pueden ajustarse posteriormente mediante el uso de sustancias absorbedoras o adsorbedoras en el envase para eliminar O₂, CO₂ o etileno (Kader, 2002b).

V . 1.5. PELÍCULAS EMPLEADAS EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Según Wills y col. (1998) el embalaje de los productos frescos tiene, en la actualidad, que cumplir con una serie de requisitos que se pueden resumir en:

1. Debe tener resistencia mecánica suficiente para proteger el contenido durante el transporte y manipulación.
2. La resistencia mecánica debe verse poco afectada por el contenido de humedad cuando se moja o se somete a una atmósfera húmeda.
3. No debe contener sustancias químicas que puedan transferirse al producto y que sean tóxicas para él o para el hombre.
4. Debe cumplir las exigencias del mercado y las necesidades impuestas por el manejo en lo que se refiere a peso, forma y tamaño.
5. Debe permitir el enfriamiento rápido de su contenido y/u ofrecer un grado de aislamiento para condiciones extremas de frío o calor.

6. Usados como barreras gaseosas, deben tener la permeabilidad suficiente a los gases de respiración a fin de impedir el riesgo de anaerobiosis.
7. Debe identificar su contenido y disponer de instrucciones de manejo a través de una comprensiva y exacta rotulación.
8. En algunos casos debe ser opaco y en otros transparente.
9. Puede diseñarse para ser descartado, reusado o reciclado.
10. El costo del envase en relación con el contenido y con el tiempo de protección que haya de darle debe ser tan bajo como sea posible.

Al referirnos exclusivamente a películas plásticas utilizadas para el envasado en atmósferas modificadas de frutas y hortalizas frescas, Kader y col. (1989), destaca las siguientes características:

- Adecuada permeabilidad a los diferentes gases
- Buena transparencia
- Peso ligero
- Elevada resistencia mecánica
- Termosellable
- No tóxica
- Estable frente a condiciones ambientales
- Fácil de manipular
- Fácil de imprimir a efectos del etiquetado

Se dispone de muchas películas plásticas pero relativamente pocas se han utilizado para recubrir productos frescos y pocas tienen una permeabilidad gaseosa adecuada que permita su utilización para AMP. Debido a que el contenido de O₂ en una AMP se reduce generalmente desde el 21% (aire) al 2-5%, resultaría peligroso el incremento del CO₂ desde el 0,03% (aire) al 16-19% que se produciría en la atmósfera que rodea al producto. Es por ello que la permeabilidad al CO₂ de la película debería ser aproximadamente 3 a 5 veces superior a la permeabilidad al O₂ (Kader, 2002b).

Entre los materiales utilizados para los envases se encuentran películas de poliolefinas, polietileno y polipropileno así como copolímeros (Del Valle y Palma, 1997)

El polietileno de baja densidad es la película más usada en el envasado de frutas y vegetales. El polietileno es permeable a muchos compuestos volátiles y a numerosos gases y relativamente impermeable al vapor de agua (Wills y col., 1998).

Otra de las películas ampliamente utilizada es el cloruro de polivinilo. Asimismo, se ha utilizado el poliestireno pero el Saran y el poliéster tiene permeabilidades gaseosas tan bajas que solo pueden ser utilizados en productos con muy baja velocidad de respiración. Algunas de las películas recientemente desarrolladas tienen en cuenta las necesidades de cambios de permeabilidad con la temperatura, incremento de la difusión gaseosa mediante el uso de microperforaciones, facilidad de impresión y uso en máquinas, mantenimiento de la integridad cuando está sellada y la habilidad de resellar las bolsas, claridad y características antiniebla (Kader, 2002b).

V . 1.6. EFECTOS METABOLICOS DE LAS ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Generalmente se ha asumido como razón principal de las consecuencias beneficiosas de las AM en frutas y vegetales, el efecto de la reducción de O_2 y/o elevación de CO_2 en la disminución de la velocidad de respiración. Esto es una sobresimplificación puesto que el deterioro postcosecha de un producto fresco puede estar causado por muchos factores sumados a la alta velocidad de respiración.(Kader, 1986).

Por otra parte, aún si se controlaran todas las variables y la atmósfera interna se equilibra en los niveles previstos y recomendados, existen el problema que el consumo de O_2 y la producción CO_2 por los productos están metabólicamente interrelacionado, haciendo difícil el estudio del efecto de un gas independiente del otro (Saltveit, 2003b).

De cualquier manera, se ha visto que el almacenaje en AM retrasa y/o disminuye la magnitud de los cambios metabólicos (Del Valle y Palma, 1997).

Estos autores resumen los efectos generales de estas atmósferas sobre el deterioro de los productos hortícolas en:

FACTORES QUE DETERMINAN EL DETERIORO DEL PRODUCTO	EFECTOS GENERALES DE	
	Reducción de O ₂	Aumento de CO ₂
A. Respiración		
Tasa respiratoria	disminuye	disminuye
Inducción de respiración anaeróbica (fermentación)	aumenta (< 1%)	aumenta (> 20%)
B. Biosíntesis y acción del etileno		
Metionina → SAM	sin efecto	desconocido
Síntesis de ACC sintasa	sin efecto	disminuye
SAM → ACC	aumenta	desconocido
Síntesis de ACC oxidasa	desconocido	disminuye
ACC → Etileno	disminuye	disminuye
Acción del etileno	disminuye	disminuye
C. Cambios de composición		
<i>Pigmentos (color)</i>		
Degradación de la clorofila	disminuye	disminuye
Desarrollo de antocianos	disminuye	disminuye
Biosíntesis de carotenoides	disminuye	disminuye
<i>Compuestos fenólicos (color)</i>		
Compuestos fenólicos totales	desconocido	disminuye
Actividad de PPO	disminuye (cerca de 0%)	disminuye
<i>Componentes de pared celular (ablandamiento)</i>		
Actividad de PG	disminuye	disminuye
Cantidad de poliurónicos solubles	disminuye	disminuye
<i>Carbohidratos (sabor)</i>		
Conversión del almidón a azúcar	disminuye	disminuye
<i>Ácidos orgánicos y aminoácidos</i>		
Pérdida de acidez	disminuye	disminuye
Cantidad de ácido succínico	desconocido	aumenta
Ácidos aspártico y glutámico	desconocido	disminuye
Ácido δ-amino butírico	desconocido	aumenta
<i>Compuestos volátiles</i>		
Aromas y sabores característicos	disminuye	disminuye
Malos olores (acumulación de etanol y acetaldehído)	aumenta (< 1%)	aumenta (> 20%)
<i>Vitaminas</i>		
Pérdida de provitamina A (β-caroteno)	disminuye	disminuye
Pérdida de vitamina C (ácido ascórbico)	disminuye	disminuye
D. Daños físicos		
Formación de peridermis (cicatrización de heridas)	disminuye (<5%)	disminuye (>10%)
Pardeamiento de tejidos (ver efecto sobre PPO)		
Formación de etileno inducido por daño	disminuye	disminuye

E. Desórdenes fisiológicos		
Daño por frío	umenta	disminuye o aumenta*
Escaldado en peras y manzanas	disminuye	disminuye
Desórdenes inducidos por el etileno	umenta	disminuye o aumenta*
Desórdenes inducidos por CA	umenta	umenta
F. Ataque de patógenos		
Susceptibilidad a los patógenos	disminuye o aumenta*	disminuye o aumenta*
Crecimiento de hongos	disminuye (<1%)	disminuye (>10%)
Crecimiento de bacterias	disminuye ?	disminuye ?

* Varía dependiendo de la susceptibilidad del producto.

ACC: ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico;

EFE: enzima formadora del etileno;

EPG: poligalacturonasa;

PPO: polifenoloxidasas;

SAM: s-adenosil-metionina.

Extraído de Del Valle y Palma (1997)

Es importante, también, reconocer que el empaçado tiene otros efectos en las frutas y vegetales frescos, independientes de la creación de la AM. Así, los envases son barreras para el movimiento del vapor de agua y pueden ayudar en el mantenimiento de humedades relativas (HR) altas y de la turgencia de frutas y vegetales. Sin embargo, altas HR pueden ocasionar condensaciones sobre el producto creando condiciones favorables para el crecimiento de patógenos, si bien en el caso de frutas y vegetales envasados individualmente no se contaminarán otras unidades (Zagory y Kader, 1988).

Recalcando el efecto de esta tecnología en el retraso o disminución del daño por frío podemos mencionar los resultados favorables obtenidos para productos sensibles tales como lima y toronja (Wardowski y col., 1973), palta (Scott y Chaplin, 1978; Meir y col., 1997) y pepinos (Wang y Qi, 1997).

Si bien la tabla anterior explicita los efectos generales de las AM, la respuesta de los diferentes productos a las atmósferas modificadas puede, sin embargo, ser conflictiva. Por ejemplo, el incremento de CO₂ ayuda en la retención de ácidos orgánicos en tomate pero acelera la pérdida de ácidos en espárragos. Otro factor crítico es la madurez en el momento de la cosecha (Wills y col., 1998).

Además, la variabilidad biológica acoplada con el desarrollo de nuevos cultivares, tecnologías de almacenamiento y empaçado ensancha en lugar de estrechar el rango "óptimo" recomendado de niveles de O_2 y CO_2 . Otros problemas mayores incluyen las diferencias en un producto individual (por ejemplo, epidermis, tejido vascular, centro, etc), las diferencias entre productos individuales (por ejemplo, cultivar, condiciones de crecimiento), las diferencias con la edad (por ejemplo, maduración, senescencia) y las diferencias entre parámetros de calidad (por ejemplo apariencia, firmeza, sabor, contenido de vitamina) (Saltveit, 2003b). Debido a la amplia variedad de respuestas de los diferentes productos y entre cultivares, las concentraciones ideales deben ser determinadas experimentalmente para cada vegetal (Wills y col., 1998).

V . 1.7. FACTORES QUE AFECTAN LAS ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Zagory y Kader (1988) explicitaron que las condiciones creadas y mantenidas en el interior de los envases son el resultados de la interrelación entre varios factores, tanto del producto como del ambiente, que se pueden resumir en:

- Factores del producto
 - *Resistencia a la difusión de O_2 , CO_2 , etileno y H_2O .* La mayoría de las frutas y vegetales son tolerante a niveles de O_2 inferiores al 1-5% y niveles de CO_2 superiores al 5-10%. Sin embargo, las enzimas vegetales involucradas en la utilización del O_2 pueden actuar en ambientes con menos del 1% de este gas. La diferencia entre la concentración de O_2 externo (o CO_2 externo) y la cantidad de O_2 (o CO_2) disponible en el interior de la célula está determinada por la resistencia del órgano vegetal a la difusión gaseosa. Esta resistencia varia entre diferentes vegetales, cultivares, órganos vegetales y estados de madurez pero parece estar poco afectada por la temperatura.

- *Respiración.* La velocidad de respiración y el camino metabólico de ésta están sujetos tanto a factores internos como externos. Es sabido que la velocidad de respiración cambia a medida que el producto atraviesa su proceso natural de maduración fisiológica, maduración organoléptica y senescencia. Ciertas frutas (por ejemplo, manzana, kiwi, pera, tomate) experimentan un marcado incremento en la respiración durante su maduración, conocido como climaterio, que está asociado a una producción y sensibilidad incrementada al etileno. La relación entre el CO₂ producido y el O₂ consumido, denominada cociente respiratorio (RQ), se supone normalmente igual a uno pero puede variar entre 0,7 y 1,3 dependiendo del sustrato metabólico utilizado. Existen algunas sugerencias de que las condiciones de AM pueden alterar el RQ lo que afectará la atmósfera creada por la respiración del producto en el interior del envase.
- *Producción de etileno y sensibilidad.* La exposición de frutas climatérica al etileno acelera el incremento irreversible de la velocidad de respiración y la madurez. La reducción de la producción y sensibilidad al etileno asociadas a las AM pueden retrasar el climaterio y prolongar la vida de almacenamiento de estos productos. Aún los productos no climatéricos pueden beneficiarse por la reducción de su sensibilidad al etileno y la disminución en la velocidad de respiración atribuida a la AM.
- *Temperatura óptima.* Los procesos metabólicos son sensibles a la temperatura. Las reacciones biológicas generalmente se incrementan dos o tres veces por cada 10°C de aumento en la temperatura de lo que se deduce que cuanto más baja sea la temperatura más largo será su período de conservación. Sin embargo, cada producto tiene un límite de temperatura por debajo del cual puede presentar daño por frío que incrementa su intensidad respiratoria, acelerando la senescencia y reduciendo el valor del producto. La temperatura óptima es aquella a la cual se retrasa la senescencia y se mantiene la calidad

por el mayor tiempo posible sin causar daño por frío, congelación u otro daño.

- *Humedad relativa óptima.* Humedades relativas bajas puede incrementar la transpiración y producir deshidratación e incrementar la respiración transformando al producto en no comercializable. Uno de los beneficios de esta tecnología es mantener una adecuada humedad relativa. Ya se mencionó las consecuencias, sobre el crecimiento microbiano, de condensaciones localizadas del vapor de agua en productos almacenados bajo condiciones de HR altas. Hay que considerar, además, el efecto adverso de esta condensación cuando se verifica en la superficie del recubrimiento ya que afecta la permeabilidad de la película. El mantenimiento de una adecuada temperatura durante todas las etapas postcosecha es central para prevenir estas condensaciones.
- *Concentraciones óptimas de O₂ y CO₂.* Los diferentes productos varían ampliamente en su tolerancia de atmósferas diferente. Estos límites dependen de varias variables tales como temperatura, condición fisiológica, madurez y tratamiento previo. Puesto que las atmósferas en el interior de los envases pueden fluctuar levemente, la atmósfera “óptima” no debería ser próxima a las atmósferas perjudiciales.

- Factores ambientales

- *Temperatura y humedad relativa.* El producto puede calentarse o enfriarse más lentamente según esté recubierto por un film o expuesto directamente a las condiciones ambientales. Los cambios de temperatura también afectan la permeabilidad de la película de recubrimiento. En general, ésta aumenta con el incremento de la temperatura viéndose más afectada la permeabilidad del CO₂ que la del O₂. Esto refuerza, una vez más, la importancia del cuidadoso control de la temperatura del producto empacado.

- *Luz*. Para muchos productos la luz no tiene consecuencias importantes en su manejo postcosecha. Sin embargo, los vegetales verdes en presencia de luz suficiente pueden consumir cantidades sustanciales de CO₂ y producir O₂ a través de la fotosíntesis. Estas reacciones son antagónicas con el proceso de respiración que ayuda a mantener la atmósfera.
- *Factores sanitarios*. El empaque de frutas y vegetales frescos crea condiciones ambientales para el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Botrytis* y *Geotrichum* por lo que se hace necesario su tratamiento con funguicidas.

V . 1.8. JUSTIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO SELECCIONADO

Existen en la bibliografía varios trabajos referidos al almacenamiento en atmósfera modificada de berenjenas (Fallik y col., 1995; Rodríguez, 2000; Concellón, 2003) y Cantwell y Suslow (2000) destacan esta tecnología en la reducción del daño por frío.

Particularmente se subraya el trabajo de tesis realizado por Rodríguez (2000) en el que se ensayaron diferentes tratamientos postcosecha en berenjenas del mismo cultivar utilizado en esta tesis (Black nite). Así, se probaron tratamientos térmicos por inmersión en agua caliente, tratamientos con aire caliente seco y almacenamiento en atmósfera modificada pasiva en bolsas de PEBD.

Los tratamientos que resultaron efectivos para reducir la incidencia del daño por frío en berenjenas Black nite fueron con aire a 35°C durante 1 h y almacenamiento en AMP. El almacenamiento en AMP, específicamente, retardó la aparición y la evolución del daño extendiendo su límite de comercialización hasta 12 días en condiciones refrigeradas.

V . 2. OBJETIVOS

V . 2.1. Objetivo general

Investigar el efecto del almacenamiento en atmósfera modificada pasiva en la reducción o retardo de la incidencia del daño por frío en berenjenas Black nite y comparar los parámetros analizados con los de los frutos que sólo fueron refrigerados.

V . 2.2. Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- a) Evaluar la evolución del daño por frío en los frutos durante del almacenamiento en atmósfera modificada pasiva determinando la pérdida de electrolitos y su incidencia en el color cotejando los resultados con los frutos almacenadas a 3°C.
- b) Estudiar las variaciones de los compuestos fenólicos y flavonoides y la capacidad antioxidante de berenjenas Black nite almacenadas en AMP y compararlas con los valores correspondientes de los frutos dañados.
- c) Determinar la modificación de la actividad de lipoxigenasa de los frutos sometidos al tratamiento en relación con los que sufrieron estrés térmico.
- d) Examinar los cambios en los principales ácidos grasos, fosfolípidos y en el nivel de peroxidación de berenjenas Black nite conservadas en AMP estableciendo su paralelismo con los frutos testigos almacenados a 3°C.

V . 3. MATERIALES Y MÉTODOS

V . 3.1. Material vegetal

Se trabajó con berenjenas del cultivar Black nite provenientes de una finca ubicada en la localidad de La Dársena del Departamento Banda, Provincia de Santiago del Estero, Argentina.

Los frutos se cosecharon manualmente, en horas tempranas de la mañana, con grado de madurez comercial correspondiente a un peso de 300 – 400 g, y se seleccionaron según forma, tamaño y ausencia de defectos.

Una vez en el laboratorio, los frutos se lavaron con agua clorada, se escurrieron y se dejaron secar.

V . 3.2. Almacenamiento

Los frutos se envasaron individualmente en bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) perforadas (190 perforaciones/m² de 13 mm de diámetro) para permitir un buen intercambio gaseoso. Posteriormente se conservaron a 3°C durante 12 días constituyéndose éstos en frutos testigos.

Se extrajeron muestras, compuestas de cinco frutos cada una, a los 0,5, 1, 2 y 3 días de conservación y, posteriormente, cada 3 días hasta finalizar la experiencia. A cada tiempo, una muestra de las berenjenas que permanecieron a 3°C, fue transferida a 20°C durante 48 horas para simular las condiciones de venta.

V . 3.3. Tratamiento con atmósfera modificada pasiva (AMP)

Las berenjenas se empaquetaron individualmente en bolsas selladas de PEBD sin perforar. Luego, se conservaron a 3°C y se extrajeron muestras de igual manera que los frutos almacenados a bajas temperaturas, realizándose, asimismo, la transferencia a 20°C durante 48 horas de los frutos almacenados a 3°C.

Las características de permeabilidad de la película utilizada para el envasado son las siguientes:

- Permeabilidad al O₂: 7000 – 8000 cm³ / m² 24 h a 25°C.
- Permeabilidad al CO₂: 20000 – 26000 cm³ / m² 24 h a 25°C.
- Permeabilidad al vapor de agua: 3 – 5 g / m² 24 h.

La concentración de CO₂ alcanzada al cabo de 9 días de almacenamiento fue de 1,2%, 19,7% de O₂ y el resto nitrógeno (Rodríguez, S. 2000).

V . 3.4. Determinaciones

V . 3.4.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño

La evaluación de los síntomas visuales de daño por frío así como el cálculo del índice de daño se realizó tal como se describe en el apartado I.3.3.1.

V . 3.4.2. Pérdida de electrolitos

Al inicio y a cada tiempo de muestreo se determinó la pérdida de electrolitos a través de la medición de la conductividad eléctrica siguiendo la metodología descrita en el apartado I.3.3.2 y expresando los resultados de igual forma.

V . 3.4.3. Pardeamiento de la pulpa, potencial de oxidación y color de la piel

El valor de L₀ se determinó de igual manera que en el apartado I.3.3.3.

La metodología descrita en I.3.3.4 se empleó para medir y calcular el potencial de oxidación de las berenjenas muestreadas y, conforme a lo descrito en el ítem I.3.3.5, se realizaron las determinaciones y cálculo de los parámetros de color de la piel.

V . 3.4.4. Fenoles y flavonoides

Sus cuantificaciones se efectuaron según los métodos descritos en los incisos II.3.3.1 y II.3.3.2, respectivamente.

V . 3.4.5. Capacidad antiradical

A cada tiempo de muestreo se midió la capacidad antioxidante de los frutos tal como se detalla en II.3.3.4.

V . 3.4.6. Medición de la actividad de lipoxigenasa

La actividad de lipoxigenasa se determinó de igual forma que la enunciada en el ítem III.3.3.1. Los resultados se expresan como actividad específica determinándose el contenido de proteínas por el método de Lowry descrito en III.3.3.3.

V . 3.4.7.- Ácidos grasos y fosfolípidos

Para cada período de almacenamiento se cuantificó el contenido de ácidos grasos y fosfolípidos siguiendo la metodología detallada en los apartados IV.3.3.2 y IV.3.3.3, respectivamente.

V . 3.4.8. Peroxidación de lípidos

El grado de peroxidación lipídica se efectuó de igual manera a la descrita en IV.3.3.4.

V . 3.4.9. Análisis estadístico

Se empleó un diseño factorial y se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA) de los resultados comparándose las medias con el test LSD para un

nivel de significancia (α) igual a 0,05 utilizándose el software estadístico SPSS 10.0.

Los factores analizados fueron tratamientos y tiempo de almacenamiento.

V . 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V . 4.1. Características visuales de daño por frío e índice de daño

Los primeros síntomas de daño por frío de los frutos almacenados en atmósfera modificada pasiva se presentaron recién a los 6 días de almacenamiento a 3°C al cabo de los cuales 1 - 2 frutos manifestaron un daño incipiente caracterizado sólo por la aparición de un punteado superficial. Tanto el número de frutos afectado como los síntomas registrados fueron aumentando levemente con el tiempo de conservación y, luego de 12 días, las berenjenas presentaron, en su mayoría, ligeras depresiones de tamaño pequeño distribuidas heterogéneamente en su superficie correspondiente a las características calificadas como daño moderado. La Figura V.1 muestra los frutos conservados en AMP por 12 días y en ella puede apreciarse su buen estado de conservación general.

Las berenjenas transferidas a 20°C por 48 horas presentaron una evolución de los síntomas de daño más marcada acompañando, a las depresiones típicas, la aparición del marchitamiento y pardeamiento del cáliz al cabo de 12 días de conservación refrigerada tal como puede notarse en la Figura V.2. Asimismo, aumentó el número de frutos que presentaron estas características conservando, igualmente, un buen aspecto general.

En la Figura V.3 se muestra la evolución del índice de daño tanto de los frutos testigo como el de los frutos sometidos al tratamiento postcosecha. Estos últimos presentaron un ID promedio de 1,3 al cabo de 6 días de refrigeración, marcadamente inferior al manifestado por los frutos testigo aún luego de 3 días de conservación. El incremento del ID con el tiempo de almacenamiento fue mucho más lento en las berenjenas conservadas en film comparado con las testigos tal como puede observarse en dicha Figura. Al cabo de los 12 días, los frutos sometidos a la AMP alcanzaron un ID de 2,2 correspondiente a un daño entre incipiente y moderado y no superaron el límite fijado para su comercialización (ID = 2,5). El ID fue, aproximadamente, un 50% inferior al de los frutos testigo.



Figura V.1. Aspecto de las berenjenas Black nite al cabo de 12 días de almacenamiento a 3°C en AMP.

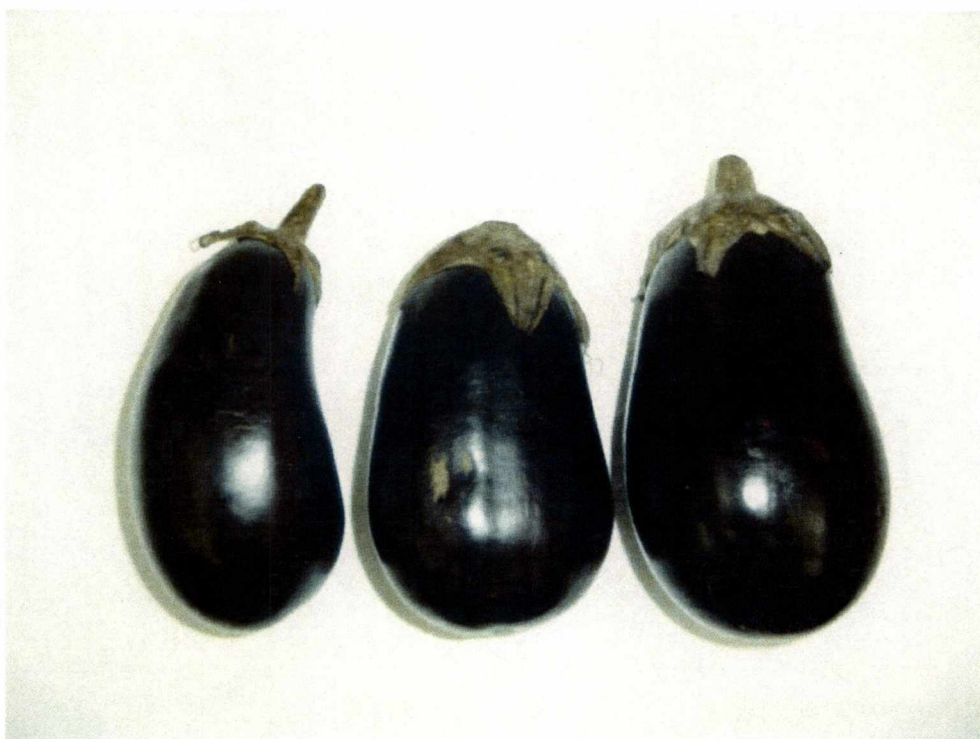


Figura V.2. Aspecto de las berenjenas Black nite luego del pasaje a 20°C por 48 horas al cabo de 12 días de almacenamiento a 3°C en AMP.

Similar comportamiento manifestaron los frutos sometidos a un pasaje por 48 horas a 20°C con respecto a los frutos testigo y el valor de ID alcanzado no presentó diferencias significativas con respecto a los frutos recién extraídos de la cámara al final del almacenamiento.

Resultados comparables fueron obtenidos por Rodríguez, S. (2000), al evaluar distintos tratamientos postcosecha de berenjenas del mismo cultivar, para la conservación con película de PEBD. Asimismo, Concellón (2003) alcanzó niveles de índice de daño similares a los 8 días de almacenamiento de berenjenas cv. Money Maker N°2 conservadas a 0°C en AMP.

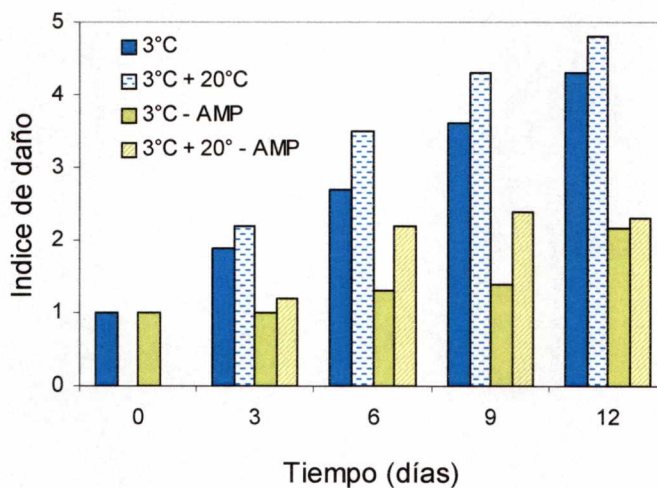


Figura V.3. Evolución del índice de daño de berenjenas Black nite almacenadas a 3°C, a 3°C en bolsas hermética de PEBD y de frutos transferidos a 20°C durante 48 h conservados en las mismas condiciones. $LSD_{0,05} = 0,64$.

De la misma manera, el envasado en bolsas de polietileno de baja densidad de berenjenas cv. Classic (1,2% CO₂ + 19,7% O₂) redujo significativamente el desarrollo de daño por frío. En tal sentido, no se observó daño en los frutos almacenados a 6°C hasta después de los 5 días y para períodos más largos de conservación el daño fue significativamente menor en los frutos envasados que en los controles sin embolsar aún luego de un pasaje por 3 días a 17°C (Fallik y col., 1995). Estos autores consignaron como posible

causa de dicho comportamiento la menor velocidad de disminución de su temperatura comparada con los frutos testigo sin embolsar.

Numerosos trabajos confirman la ventaja de la utilización de esta tecnología tanto para la prolongación de la vida útil de los productos frutihortícolas como para reducir la incidencia del daño por frío.

Así, por ejemplo, Tian y col. (2004) encontraron que el almacenamiento de cerezas dulces en AMP (13-18% O₂ + 2-4% CO₂ - 1°C) ocasionó una incidencia de enfermedades sólo en el 8% de las frutas almacenadas y la incidencia de podredumbre alcanzó el 16% luego de 50 días de conservación.

Por otra parte, Artés-Hernández y col. (2003) determinaron que uvas de mesa cv. Napoleón sometidas a tratamientos con AMP (5 kPa de O₂ + 15 kPa de CO₂ + 80 kPa de N₂ - 0°C - film polipropileno orientado) evidenciaron menos ataques de hongos, mejor mantenimiento del aroma, hidratación y color del raquis así como buena apariencia visual, sabor y textura después de un almacenamiento por 38 días y luego de un pasaje a 15°C por 6 días.

Con respecto a la incidencia del daño por frío, el almacenamiento en películas plásticas microperforadas de mango cv. Tommy Atkins redujo dramáticamente su desarrollo durante su conservación a 12°C por 21 días y, también, en la fruta sometida a un pasaje de 5 días a 20°C (Pesis y col., 2000).

Asimismo, la AMP (CO₂ 10-12 kPa + O₂ 6-7 kPa) retrasó el pardeamiento de los extremos cortados y conservó la apariencia general de hinojos cv. Orion almacenados en bolsas de polipropileno durante 14 días a 0°C y transferidos a 15°C durante 3 días. La apariencia general fue aceptable aún después del pasaje a mayor temperatura (Escalona y col., 2004).

El principio de conservación de las atmósferas modificadas coincide con el de las atmósferas controladas por lo que estas últimas también evidencian las mismas ventajas en el daño por frío. Ejemplos de ello son los almacenamientos de pimientos en 1% CO₂ + 1% O₂ y 3%CO₂ + 1% O₂ a 4 °C que fueron efectivos para reducir el daño por frío durante períodos de conservación superiores a 30 días (Yang y Lee, 1997).

V . 4.2.- Pérdida de electrolitos

La pérdida de electrolitos fue utilizada por numerosos autores como medida indirecta del daño por frío (Furmanski y Buescher, 1979; King y Ludford, 1983; Wang, 1989; Woods y col., 1991) utilizándose como método objetivo para cuantificar su severidad (Saltveit, 2002). Sin embargo, Côté y col. (1993), Saltveit (2002) y Bergevin y col. (1993) puntualizaron las limitaciones de su uso.

La Figura V.4 refleja la evolución de la pérdida de electrolitos durante el curso del almacenamiento de los frutos conservados en AMP. Se observó un incremento inicial, permaneciendo sin variaciones significativas a partir del tercer día, para aumentar nuevamente a los 12 días de conservación a niveles próximos al 12% por encima del valor inicial.

Resultados similares se obtuvieron durante el almacenamiento de zanahorias mínimamente procesadas en atmósferas controladas (40% CO₂ + 10% O₂) y conservadas a 10°C las que no mostraron variación en las pérdida de electrolitos hasta los 5 días de conservación pero a los 10 días sus niveles se incrementaron considerablemente (Carlin y col., 1990).

De igual modo, Palma y col. (1995) detectaron una disminución de este parámetro durante el almacenamiento en CA de tomates (4% de O₂ + 96% N₂ – 20°C) en comparación con los frutos testigos (20°C y 95% HR).

El pasaje a 20°C arrojó valores menores (aproximadamente 26% en promedio) salvo a los 3 días de refrigeración no encontrándose diferencias significativas entre si para períodos mayores.

Comparando la pérdida de electrolitos de las berenjenas almacenadas en AMP y las testigos, como se observa en la Figura V.5, se distinguieron diferencias significativas a los 12 días de conservación. Para este período, la pérdida de electrolitos de los frutos almacenados en AMP fue un 15% inferior a la de los frutos testigos lo que estaría relacionado con el menor nivel de daño alcanzado por los primeros.

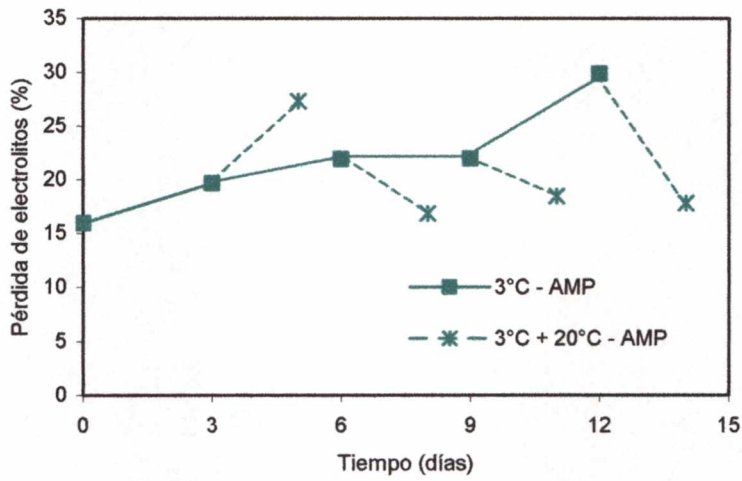


Figura V.4. Variación de la pérdida de electrolitos en berenjenas Black nite almacenadas en AMP a 3°C y frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 3,89$.

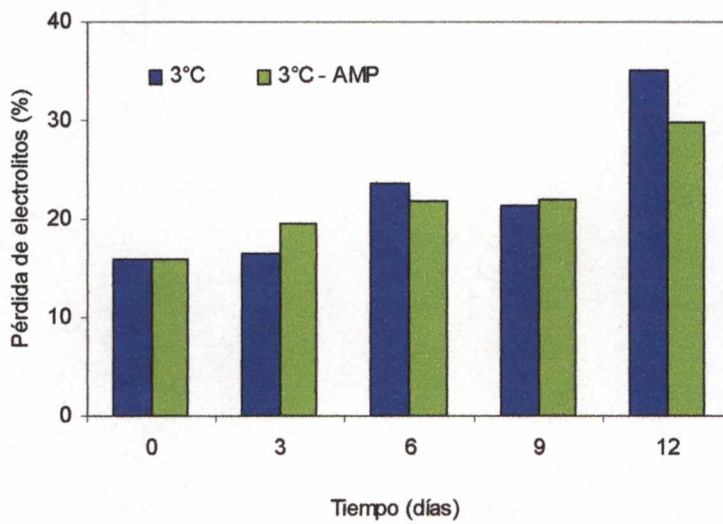


Figura V.5. Comparación de la pérdida de electrolitos en berenjenas Black nite almacenadas en AMP a 3°C y frutos testigo. $LSD_{0,05} = 3,95$.

V . 4.3. Pardeamiento de la pulpa, potencial de oxidación y color de la piel

El pardeamiento de la pulpa, que en este caso fue medido a través del parámetro L_0 del color, se describe como uno de los síntomas de daño frío de las berenjenas (Cantwell y Kasmire, 2002). Sin embargo, si se analiza la Figura V.6., donde se representa su variación durante el período de conservación estudiado, tanto para frutos almacenados en AMP como para los frutos testigos, se puede observar que los valores de luminosidad de las berenjenas almacenadas con la tecnología postcosecha propuesta no presentaron, en general, diferencias significativas con los valores correspondientes a los frutos testigo tanto a 3°C como luego del pasaje a 20°C. Asimismo, no se encontraron diferencias durante todo el almacenamiento.

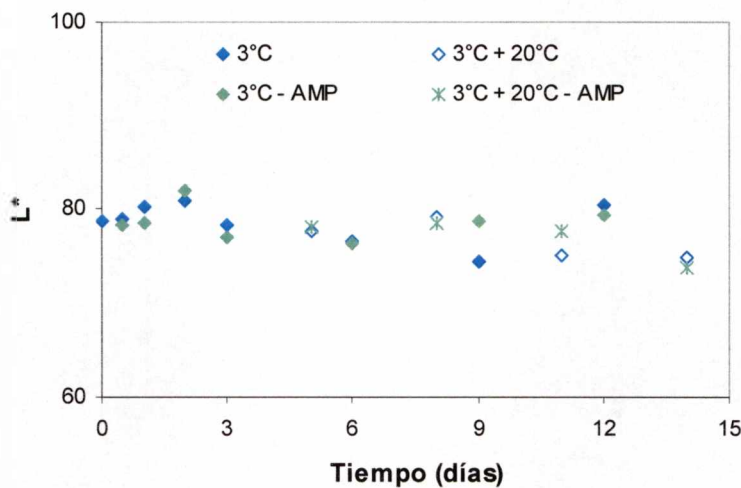


Figura V.6. Cambios del parámetro L_0 durante el almacenamiento de berenjenas Black nite a 3°C y frutos transferidos a 20°C durante 48 h. $LSD_{0,05} = 3,25$.

El potencial de oxidación, al igual que en los frutos testigo, presentó una gran variabilidad alternando entre valores positivos y negativos. No obstante, el número de muestras que presentaron valores positivos, indicativos de un mayor pardeamiento del tejido, fue menor (2-3 de 5) en los frutos almacenados en AMP que en los frutos testigo (4 de 5). Si bien no se registraron variaciones

significativas durante el almacenamiento, esto indicaría una ligera tendencia a reducir el nivel de oscurecimiento de los frutos con la tecnología postcosecha analizada. Así, por ejemplo, a los 12 días de almacenamiento el mayor valor positivo alcanzado por los frutos almacenados a 3°C en AMP fue de 0,85 contra 2,22 de los frutos testigo. Asimismo, para igual período de conservación y luego del pasaje a 20°C, el máximo valor positivo alcanzado fue de 1,44 para los frutos tratados versus 3,06 de los frutos sin tratar. La frecuencia de muestras con valores positivos del potencial de oxidación aumentó en los frutos tratados luego de la transferencia a mayor temperatura denotando un aumento de la tendencia del tejido a oscurecerse.

El color de la piel de los frutos almacenados en AMP presentó una tendencia similar a la de los frutos testigo. Así, los valores de L* presentaron incrementos similares a las 12 horas de conservación pero, mientras el valor de los frutos testigo disminuyó a partir del 3° día, el de los frutos conservados en bolsas de PEBD lo hizo a partir del 2° día. En ambos casos, los niveles de L* permanecieron sin variaciones significativas durante el resto del almacenamiento y similares a la inicial. El pasaje a 20°C arrojó valores superiores a partir del 6° día en los frutos almacenados en AMP.

La Figura V.7 representa tanto la evolución de L*, discutida en el párrafo precedente, como la evolución de a* y b*. Tanto a* como b* siguieron sentidos de variación similares al compararse los frutos almacenados en AMP y los frutos testigo. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los valores de a* los que, en general, fueron menores para los frutos tratados. Por otra parte, b* aumentó a partir del 3° día (aproximadamente un 40%) continuando lentamente esta tendencia hasta el término de la conservación.

Concellón (2003) observó un aumento en los valores de b* en la zona del cáliz de berenjenas Money Maker N°2 conservadas a 0°C que correlacionó con una disminución en el contenido de antocianinas si bien no registró variaciones de color en la zona central.

El comportamiento descrito para los parámetros de color marcó una tendencia particular para el Cr al observarse una disminución de esta medida a

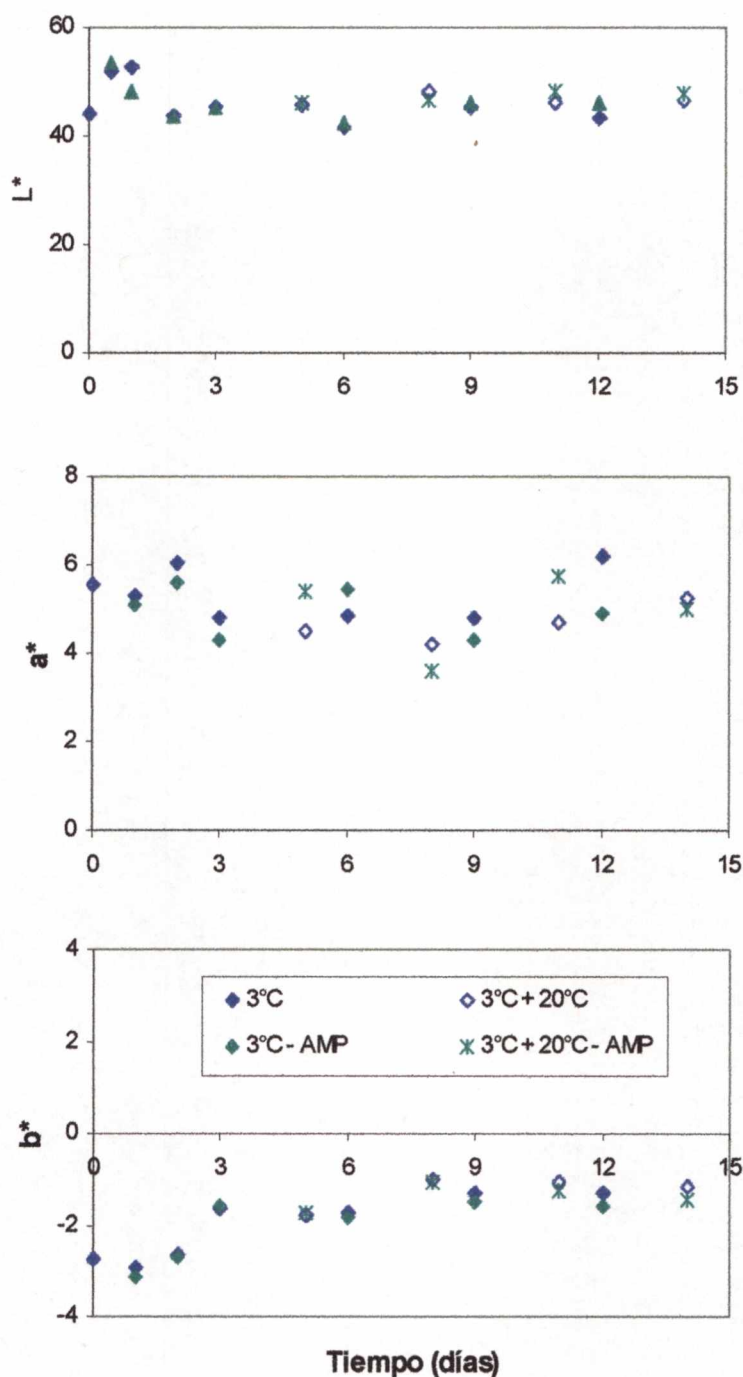


Figura V.7. Variación de las coordenadas de color L^* , a^* y b^* de berenjenas Black nite durante el almacenamiento a 3°C en bolsas de PEBD perforadas y sin perforar y luego del pasaje a 20°C por 48 h. $\text{LSD}_{0,05}$ (L^*) = 1,66; $\text{LSD}_{0,05}$ (a^*) = 1,32; $\text{LSD}_{0,05}$ (b^*) = 0,35.

partir del 3° día tanto en los frutos conservados en AMP como en los frutos testigo (datos no mostrados). Los valores de Hue, no obstante, no presentaron

diferencias significativas registrándose, en ambos casos, un incremento al 3° día para continuar sin variaciones significativas hasta el final del almacenamiento.

V . 4.4. Fenoles, flavonoides y capacidad antiradical

La respuesta de los tejidos al estrés por baja temperatura se traduce en un aumento en el metabolismo de compuestos fenólicos (Rhodes y col., 1981) como mecanismo de defensa. Es así que numerosos autores han determinado comportamientos similares tanto en vegetales sensibles como en productos no sensibles al daño por frío. En tal sentido, podemos mencionar papas (López-Andréu y col., 1988), jicama (Cantwell y col., 2002), frutillas (Ayala-Zavala y col., 2004), lechuga (Leja y col., 1994), brócoli (Starzyrisca y col., 2003), etc.

La Figura V.8 representa las cantidades de compuestos fenólicos obtenidas durante nuestros ensayos. Puede apreciarse que tanto las berenjenas testigo como las almacenadas en atmósfera modificada pasiva sufrieron un marcado incremento para períodos cortos de conservación. Mientras los valores de los frutos testigo aumentaron hasta el 3° día, los frutos conservados en bolsas de PEBD sin perforar lo hicieron hasta el 2° día alcanzando valores significativamente menores que en el caso anterior. Así, la magnitud de los cambios registrados fue de 1,61 y 1,35 veces, respectivamente, en relación al valor inicial. A partir del pico registrado el día 2, las muestras tratadas verificaron una gradual disminución hasta el 6° día permaneciendo aproximadamente constante hasta el final del período de conservación. El pasaje a 20°C durante 48 horas a partir del día 6 resultó en un aumento significativo del contenido de compuestos fenólicos de los frutos sometidos a la tecnología postcosecha estudiada.

Comportamientos comparables se obtuvieron durante el pasaje a 20-22°C de cerezas dulces cv. Van envasadas en bandejas recubiertas con film de polipropileno conservadas 14 días a 1°C + 3 días a 7°C y procesadas después de 5 horas de recolección. Estas mostraron un incremento en el contenido de

polifenoles que fue un 57% superior con respecto al valor inicial (Bernalte y col., 2003).

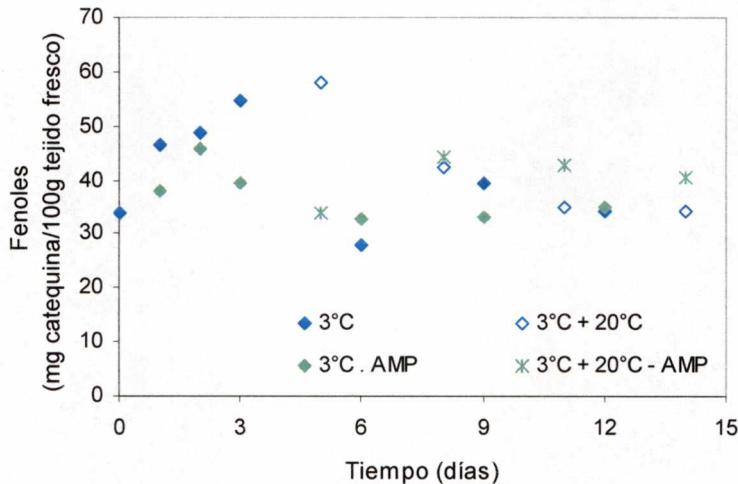


Figura V.8. Evolución del contenido global de fenoles de berenjenas Black Nite almacenadas a 3°C y en AMP a igual temperatura así como sus correspondientes pasajes a 20°C durante 48 horas. $LSD_{0,05} = 0,76$.

El contenido de flavonoides (Figura V.9) presentó, para tiempos inferiores a los 9 días, una tendencia análoga a la de fenoles totales tanto para las muestras tratadas como para los testigos ya que los flavonoides representaron, aproximadamente, el 100% del contenido global de fenoles. Para períodos superiores, donde su aporte se redujo gradualmente constituyendo, en promedio, el 89% al final de la conservación, los niveles de flavonoides permanecieron sin variaciones significativas y similares a los iniciales manteniéndose por encima de los valores determinados en los frutos testigos.

Starzyriska y col. (2003) percibieron menores niveles de flavonoides en floretes de brócoli cv. Lord var. Italica envasados en film polimérico y conservados a 5°C por 10 días versus floretes testigos sin envasar. Estos últimos aumentaron a partir de los 7 días de almacenamiento.

Por otra parte, Piretti y col. (1994) encontraron que los compuestos fenólicos de la piel de manzana Granny Smith disminuyeron a partir del día 100

hasta el final del almacenamiento (203 días) tanto en atmósfera controlada (1% O₂ + 2% CO₂) como en aire.

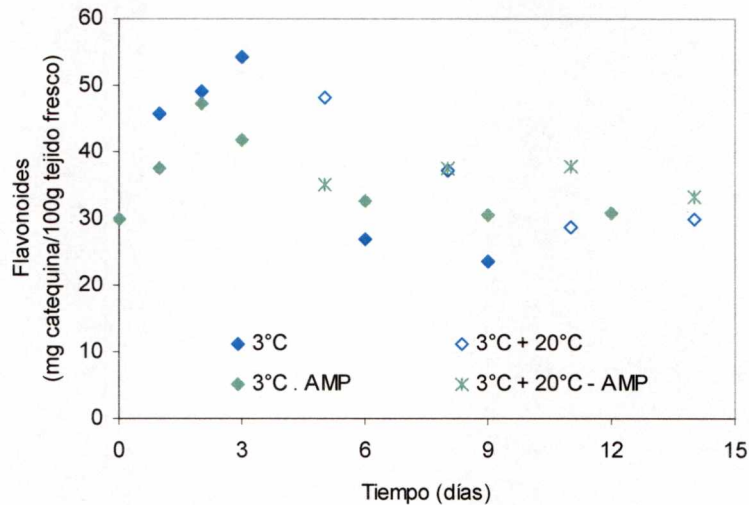


Figura V.9. Variación del contenido de flavonoides de berenjenas Black Nite durante el almacenamiento en AMP a 3°C y luego de transferidas a 20°C por 48 h. LSD_{0,05} = 1,46.

En contraste, Gil y col. (1998) reportaron que el almacenamiento en atmósferas modificadas (7% O₂ + 10% CO₂) no tenía efecto sobre el contenido de flavonoides totales después de 8 días de almacenamiento de acelga mínimamente procesada.

Puesto que los fenoles y flavonoides constituyen agentes de defensa de los tejidos contra el estrés oxidativo como lo es el daño por frío, al medir la capacidad antioxidante del tejido de berenjenas almacenadas en AMP se observó una evolución de la misma similar a las variaciones de concentración de dichos compuestos, tal como se representa en la Figura V.10.

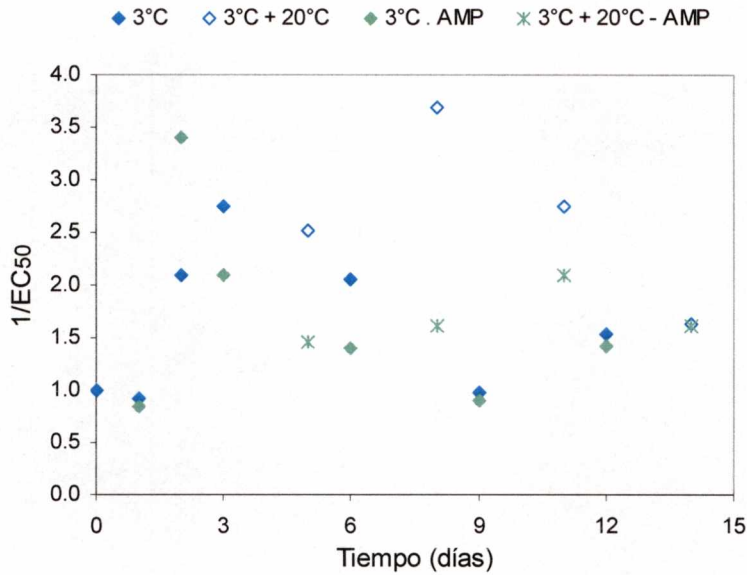


Figura V.10. Evolución de $1/EC_{50}$ de extractos de berenjenas almacenadas a $3^{\circ}C$, en AMP y luego del pasaje a $20^{\circ}C$. Los datos se expresan en unidades relativas al valor inicial. $LSD_{0,05} = 0,02$.

El marcado incremento en el contenido de fenoles, en general, y de flavonoides, en particular, registrados en los días 2 y 3 en los frutos almacenados en AMP y en los testigos se relaciona con un marcado aumento en la capacidad antioxidante. Sin embargo, los incrementos observados en el primer día, en ambos casos, concuerdan con una ligera disminución de la misma. Asimismo, si bien los niveles de flavonoides permanecieron sin variación a partir del 6° día de almacenamiento de los frutos en AMP, el comportamiento de la capacidad antioxidante de los tejidos experimentó una continua disminución hasta los 9 días, posiblemente por las síntesis de otros compuestos fenólicos diferentes de los flavonoides. Una relación positiva también se observó en los frutos sometidos al pasaje a mayor temperatura.

Starzyriska y col. (2003) encontraron una correlación altamente positiva entre el contenido de flavonoides y la actividad antiradical en floretes de brócoli del cultivar Lord var. Italica envasados en un film polimérico y conservados a $5^{\circ}C$ por 10 días vs. floretes testigos sin envasar indicando el papel importante que juegan estos compuestos del sistema antioxidante para atrapar radicales libres que son sintetizados por el tejido en condiciones de estrés. Además, la

capacidad antioxidante total determinada en floretes de brócoli del mismo cultivar, almacenados durante 7 días a 5°C, mostró un marcado incremento que fue menos rápido en el caso de muestras empacadas en film polimérico comercial que en los testigos sin empacar (Leja y col., 2001).

Gil y col (1999), al medir la actividad antiradical en tejidos de hojas de espinaca almacenadas por 7 día a 10°C, observaron que ésta fue mayor en las hojas mantenidas en aire debido al mayor contenido de flavonoides de mejor actividad antioxidante que en atmósfera controlada.

V . 4.5. Medición de la actividad de lipoxigenasa

La Figura V.11 muestra las modificaciones registradas en la actividad específica de lipoxigenasa durante la conservación de berenjenas en AMP y de los frutos testigo. De su análisis se desprende que los frutos sometidos al tratamiento postcosecha evidenciaron un aumento paulatino entre los días 1 y 6, a diferencia de los frutos testigos que lo hicieron más lentamente hasta el día 9 registrando un importante crecimiento en la actividad a las 12 horas de iniciado el almacenamiento. Superados dichos períodos, y en ambos casos, la actividad disminuyó permaneciendo sin variación hasta el final del almacenamiento en los frutos conservados en bolsas de PEBD sin perforar. Sin embargo, Zhuang y col. (1994) determinaron que el envasado en AMP de floretes de brócoli no influyó en la actividad de LOX.

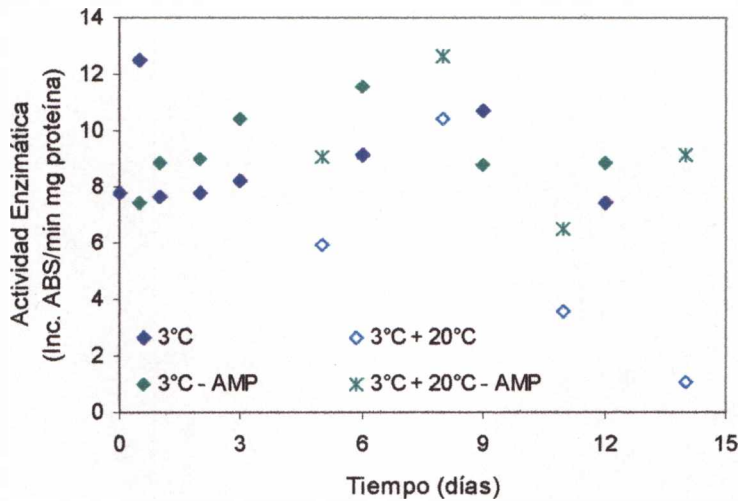


Figura V.11. Actividad específica de lipoxigenasa en berenjenas Black nite conservadas a 3°C, en AMP y transferidas a 20°C por 48 h. $LSD_{0,05} = 0,98$.

El aumento de temperatura al que fueron sometidos los frutos tratados para simular condiciones de venta inclinó sus niveles de actividad enzimática a valores menores a los 3 y 9 días, a valores mayores a los 6 días e iguales a los 12 días. Idéntico comportamiento verificaron los frutos testigo a excepción del final de la conservación donde las mediciones señalaron una marcada disminución.

V . 4.6.- Ácidos grasos y fosfolípidos

En la Figura V.12 se reproducen los contenidos de los principales ácidos grasos determinados en las berenjenas almacenadas en AMP conjuntamente con los niveles encontrados en los frutos testigo.

Se observa que el nivel de ácido palmítico de los frutos conservados en atmósfera modificada experimentó una disminución durante las primeras 24 horas aumentando luego considerablemente hasta el 3° día hasta niveles próximos a un 100% en relación al valor inicial. Para mayores tiempos de conservación se observó una reducción paulatina sin encontrarse diferencias significativa a los 9 y 12 días. El contenido de ácido palmítico de los frutos

testigo fue siempre mayor para tiempos de refrigeración superiores a los 3 días. La transferencia de las berenjenas a mayor temperatura arrojó valores inferiores tanto en los frutos almacenados en AMP como en los testigos sin encontrarse diferencias marcadas entre ambos.

Por su parte, el ácido oleico presentó un comportamiento similar en ambos métodos de conservación a excepción del momento en el que se registró su incremento (para tiempos cortos). En los frutos empacados en AMP este aumento se registró a los 2 días mientras que en los testigos se verificó a los 3 días. Sin embargo, las proporciones de aumento no fueron significativamente diferentes al igual que los niveles alcanzados para tiempos mayores de almacenamiento. Al igual que en el caso anterior, el pasaje a 20°C trajo como consecuencia una disminución en el contenido de este ácido graso siendo menores los valores obtenidos para las berenjenas tratadas.

Por otra parte, tanto el ácido linoleico como el linolénico evidenciaron una disminución inicial en su concentración seguida de un progresivo incremento registrándose el valor máximo al 3° día. No obstante, a los 3 días de almacenamiento, el nivel de ácido linoleico fue significativamente menor en los frutos tratados con respecto a los testigos mientras que el contenido de ácido linolénico no evidenció diferencias significativas. A partir del 6° día, ambos ácidos grasos volvieron a disminuir sin manifestarse diferencias entre ambos ensayos hasta el final de la conservación.

Leja y col. (2001) encontraron que el nivel de ácidos grasos poliinsaturados aumentó en brócoli tanto empacado en film polimérico comercial como no empacado y conservados a 5°C. Dicho incremento se registró al cabo de 7 días debido a la acumulación de 18:2 y 18:3 y una disminución en los ácidos grasos saturados.

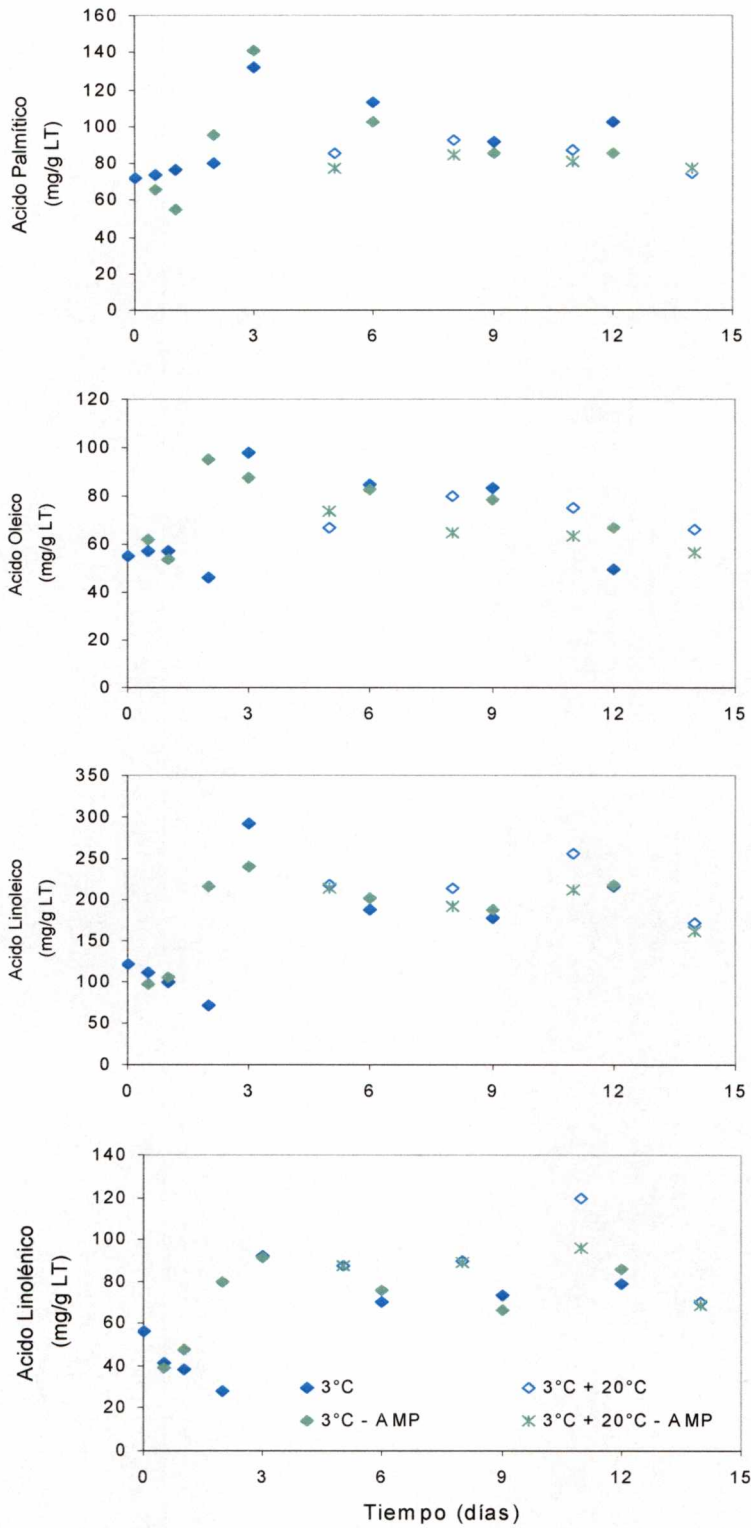


Figura V.12. Evolución de los principales ácidos grasos de berenjenas Black nite durante el almacenamiento refrigerado, en AMP y transferidas a 20°C por 48 horas. $LSD_{0,05}$ (Palmítico) = 11,44; $LSD_{0,05}$ (Oleico) = 11,30; $LSD_{0,05}$ (Linoleico) = 18,42; $LSD_{0,05}$ (Linolénico) = 9,06.

Asimismo, Zhuang y col. (1994) percibieron comportamientos similares a los nuestros en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de floretes de brócoli almacenados en MAP (7,5% CO₂ - 11,2% O₂ - 5°C). Luego de una disminución en sus niveles en las primeras 24 horas, registraron un incremento paulatino para alcanzar concentraciones unos 5-12% superiores a partir de los 4 días de conservación. Sin embargo, observaron cambios inversos en los ácidos grasos saturados y oleico.

La evolución del ácido linolénico de los frutos sometidos al pasaje a 20°C fue similar en ambos casos, observándose niveles superiores a los 6 y 9 días de tratamiento para, finalmente, alcanzar niveles menores de concentración. Por su parte, el contenido de ácido linoleico también fue parecido en ambos casos siendo siempre mayor en los que no estuvieron sujetos al tratamiento postcosecha.

La Figura V.13 describe el comportamiento del contenido de fosfolípidos para las condiciones ensayadas. De su análisis se desprende que los niveles de fosfolípidos de los frutos tratados, luego de una reducción durante las primeras horas de conservación, registraron un incremento a los 3 días alcanzando concentraciones superiores (10%) a las del inicio del almacenamiento. Un comportamiento similar se evidenció en los frutos testigo pero desplazado en el tiempo ya que, luego de una continua disminución hasta el 2° día, registraron un aumento paulatino en el contenido de fosfolípidos hasta los 6 días, período en el cual alcanzaron niveles superiores en un 15% al contenido inicial. Los frutos tratados conservaron dicho nivel a los 6 días, aumentó a los 9 días y experimentaron una disminución hacia el final rondando valores un 33% menores que los iniciales. La magnitud de esta disminución fue menos marcada en los frutos testigo que alcanzaron una concentración 1,3 veces mayor que la de los frutos conservados en AMP. El pasaje a mayor temperatura imprimió un aumento en la concentración de fosfolípidos en los frutos tratados luego de 12 días de almacenamiento refrigerado mientras que los frutos testigo evidenciaron aumentos a partir del 6° día de refrigeración.

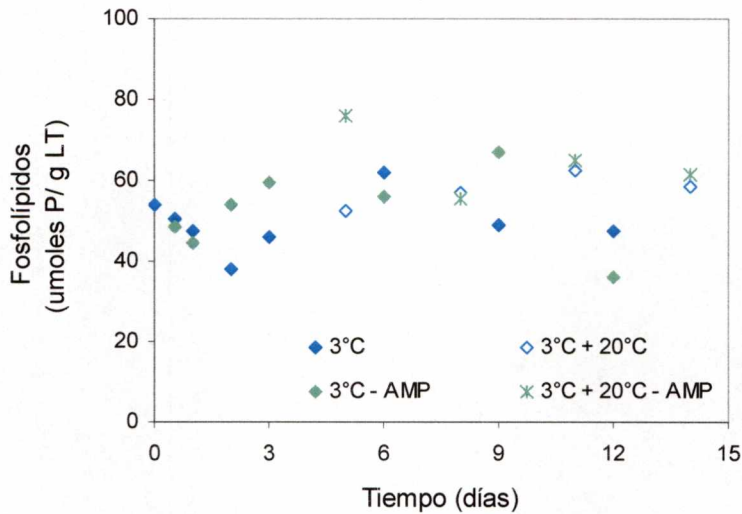


Figura V.13. Modificación de fosfolípidos de berenjenas Black nite durante el almacenamiento refrigerado, en AMP y transferidas a 20°C por 48 horas. $LSD_{0,05} = 5,13$.

V . 4.7. Peroxidación de lípidos

Los cambios observados en el grado de peroxidación lipídica durante nuestros ensayos, medidos a través de las concentraciones de MDA y MA, se reflejan en la Figura V.14. Hasta el 6° día de refrigeración se observan comportamientos similares en dichos compuestos caracterizados por un sostenido aumento en sus concentraciones siendo los valores máximos alcanzados por los frutos testigo significativamente mayores que los de los frutos tratados. Así, los contenidos de MDA y MA en los primeros fueron, respectivamente, 1,2 y 1,1 veces mayores que en los segundos. Por otra parte, en los frutos conservados en AMP, dichos máximos superaron 2,3 y 2 veces, respectivamente, a los niveles iniciales.

Condiciones de almacenamiento de cerezas dulces cv. Lapis en bolsas de polietileno (13-18% O_2 + 2-4% CO_2 - 1°C) demostraron un incremento permanente en el contenido de MDA con el tiempo de almacenamiento. (Tian y col., 2004). Sin embargo, una disminución en el contenido de MDA y MA se encontró luego de 7 días de almacenamiento a 5°C en floretes de brócoli siendo ésta más marcada en muestras empacadas. (Leja y col., 2001)

Superados los 6 días de almacenamiento, tanto la concentración de MDA como la de MA de los frutos tratados, experimentaron una reducción continua hasta el final de la conservación distinguiéndose la disminución de MDA que alcanzó niveles idénticos a los valores iniciales. Este comportamiento fue menos marcado en los frutos testigo, que mantuvieron constantes su grado de peroxidación a partir de 9° día, estabilizándose en niveles superiores a los de los frutos tratados.

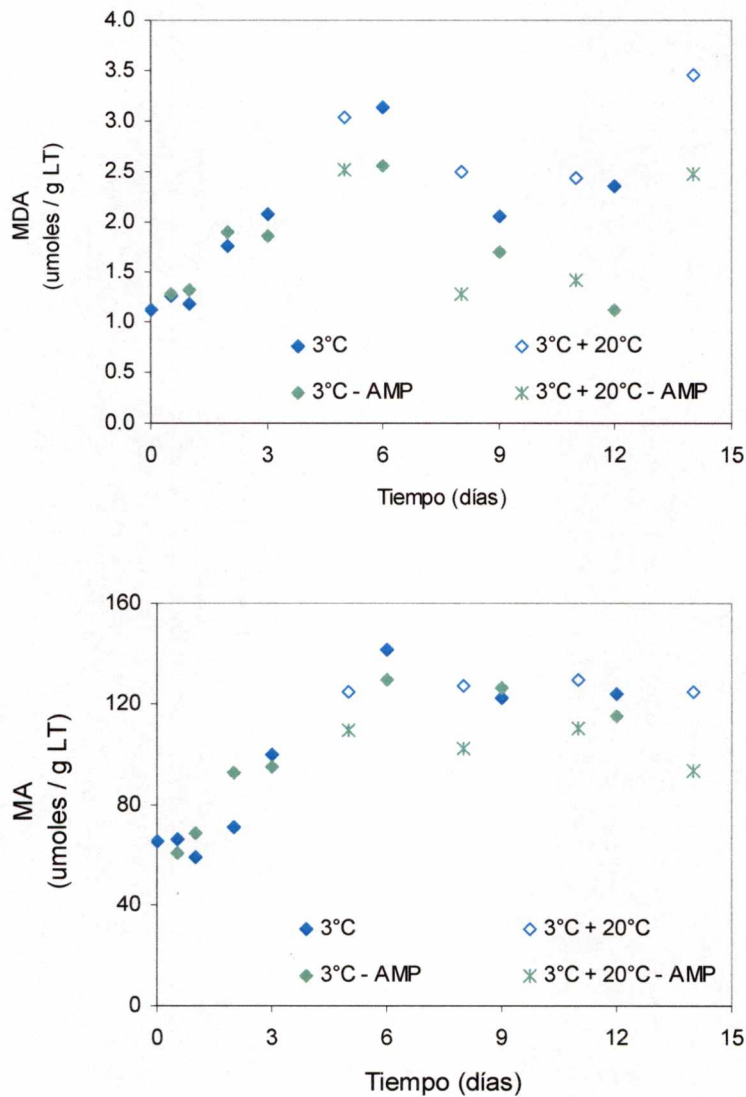


Figura V.14. Contenido de malondialdehído y monoaldehídos de berenjenas Black nite durante el almacenamiento refrigerado, en AMP y en frutos transferidas a 20°C por 48 horas. $LSD_{0,05}$ (MDA) = 0,84; $LSD_{0,05}$ (MA) = 3,75.

La transferencia de los frutos a mayor temperatura redundó siempre en un menor contenido de MDA y MA en los frutos conservados con la tecnología estudiada que en los frutos de referencia. Para tiempos de almacenamiento superiores a los 6 días, la concentración de MA fue menor en los frutos empacados en AMP mientras que en los refrigerados no se advirtieron diferencias significativas. Sin embargo, la concentración de MDA fue mayor en los frutos testigo a los 9 y 12 días y en los frutos tratados sólo se observó un incremento marcado al final del almacenamiento.

V . 5. CONCLUSIONES

- El almacenamiento en AMP de berenjenas Black nite retarda la aparición del daño y la evolución del ID que se mantiene dentro del límite establecido para la comercialización de los frutos aún después de 12 días de conservación refrigerada.
- Para tiempos largos de almacenamiento, la pérdida de electrolitos de los frutos recubiertos con PEBD fue menor que en los frutos testigo.
- Cualitativamente, existiría una ligera tendencia a reducir el nivel de oscurecimiento de los frutos con la tecnología postcosecha analizada.
- Las variaciones en las concentraciones de fenoles totales y flavonoides como respuesta al estrés térmico fue menos marcada en los frutos almacenados en AMP manteniéndose constantes los niveles en los últimos a partir del 6 día de almacenamiento, por encima de los niveles de los frutos testigo.
- La capacidad antioxidante de los frutos conservados en AMP fue menor a la de los frutos testigo para tiempos de almacenamiento iguales y superiores a los 3 días, existiendo una relación positiva entre ésta y los contenidos de fenoles totales y flavonoides. Sin embargo, a los 2 días de conservación se observó un incremento más marcado en los frutos conservados en bolsas de PEBD.
- Los frutos sometidos al tratamiento postcosecha evidenciaron un aumento paulatino en la actividad de LOX más marcado que los frutos testigo.
- Se observó un aumento mayor en el nivel de ácido palmítico de los frutos conservados en atmósfera modificada pasiva a los 3 días de

almacenamiento notándose una reducción paulatina para mayores tiempos de conservación. El contenido de ácido palmítico de los frutos testigo fue siempre mayor para tiempos de refrigeración superiores a los 3 días.

- El nivel de ácido linoleico fue significativamente menor en los frutos tratados con respecto a los testigos mientras que el contenido de ácido linolénico no evidenció diferencias significativas.
- Se observó un adelantamiento en el incremento de los niveles de fosfolípidos de los frutos tratados que alcanzaron niveles menores al de los frutos testigo al final de la conservación.
- Los niveles de peroxidación lipídica de los frutos almacenados en AMP fue menos marcada que la de los frutos sin envasar.

DISCUSIÓN GENERAL

Las berenjenas de la variedad Black nite estudiadas son de color púrpura oscuro y forma elongada. Se cosechan cuando están fisiológicamente inmaduras, a los 13 días de desarrollo, y alcanzan el tamaño óptimo para su comercialización con un peso medio de 317 ± 36 g y un volumen medio de 510 ± 70 cm³ (Rodríguez, 2000).

Dado su origen subtropical, los frutos son susceptibles al daño por frío cuando se almacenan a temperaturas inferiores a 10°C (Cantwell y Suslow, 2000).

Es por ello que en este trabajo se planteó como objetivo general estudiar el efecto de las bajas temperaturas en algunos aspectos fisiológicos y su relación con el desarrollo de daño por frío y observar la influencia de su almacenamiento en atmósferas modificadas pasivas como tratamiento para retardar su manifestación.

En las berenjenas Black nite se observó daño por frío a partir del tercer día de almacenamiento a 3°C manifestándose éste, inicialmente, como punteado superficial y luego con la aparición de zonas pardas, decoloración del cáliz, pardeamiento de semillas y pulpa. Estos síntomas de daño fueron incrementándose con el tiempo de almacenamiento y se acentuaron con el pasaje de los frutos a 20°C.

El aumento en la pérdida de electrolitos, relacionada con el aumento en la permeabilidad de la membrana asociados al daño por frío de tejidos sensibles (Saltveit, 2002), fue significativo una vez que los frutos alcanzaron un índice de daño superior a 2,5 que corresponde a un daño severo o muy severo. Este comportamiento confirmó la limitación del uso de este parámetro como medida indirecta del daño por frío (Côté y col., 1993; Saltveit, 2002; Bergevin y col., 1993) durante las primeras etapas de su desarrollo. Tanto el almacenamiento como la transferencia de los frutos a 20°C evidenciaron valores de pérdida de electrolitos mayores que a 3°C demostrando el mayor daño de los primeros.

Los frutos alcanzaron un nivel de daño moderado al final del período de almacenamiento estudiado (12 días) y el pardeamiento de la pulpa y su potencial de oxidación no evidenciaron diferencias significativas en el tiempo. El ligero pardeamiento interno de la pulpa que caracteriza el nivel del daño es sólo uno de los síntomas ponderado en su evaluación.

Asimismo, el parámetro Cr del color de la piel disminuyó a los 3 días de conservación manifestando una disminución en el grado de saturación del color el que aumentó hacia el final del almacenamiento. Por su parte, el parámetro Hue así como la luminosidad registraron un incremento a los 3 días y 24 horas, respectivamente, de almacenados los frutos a 3° permaneciendo sin variaciones durante el resto del período

estudiado. De igual modo, las manchas de daño por frío (escaldaduras) se distinguieron por valores de Hue mayores que el resto de la piel debido a su coloración marrón característica.

Determinados tipos de estrés abiótico inducen la producción de compuestos fenólicos en vegetales, incentivando el sistema antioxidante de la células para contrarrestar el incremento de radicales libres que origina el estrés oxidativo (Bartosz, 1997; Starzyriska y col., 2003). En nuestros ensayos, se encontró un marcado incremento en la concentración de fenoles totales y flavonoides durante los 3 primeros días de almacenamiento de los frutos sometidos a temperaturas de daño que se relaciona positivamente con su capacidad antioxidante. Este comportamiento indicaría una estimulación del sistema antioxidante del vegetal para contrarrestar el estrés aplicado. Sin embargo, dicha actividad antioxidante no fue suficiente para contrarrestar el daño y su manifestación.

Los principales ácidos grasos que se detectaron en las berenjenas Black nite fueron palmítico, oleico, linoleico y linolénico y su concentración se vio influenciada por la temperatura de crecimiento de los frutos siendo mayor la de ácidos saturados y monoinsaturados y menor la de poliinsaturados de los frutos desarrollados a mayor temperatura. Sin embargo esto no se reflejó en el nivel de daño alcanzado por los frutos.

Una hipótesis actual es que el daño por frío es esencialmente una forma acelerada de senescencia, en la que el efecto adverso de la baja temperatura en el metabolismo de los lípidos y en la función de la membrana originaría una cascada de reacciones deteriorativas que finalmente producen la muerte celular (Thompson, 1984b). La lipoxigenasa (LOX) juega un rol muy importante en la senescencia de los vegetales y es probablemente su función más conocida. Así, diversos estudios indicaron que un incremento en la actividad de la lipoxigenasa es un hecho común en tejidos vegetales senescentes (Siedow, 1991) y, por lo tanto, en tejidos dañados por frío.

Estos procesos deteriorativos de las membranas incluyen una disminución de la fluidez de los lípidos (Thompson, 1988; Marangoni y col., 1990), hidrólisis de fosfolípidos y la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados liberados que sirven como sustratos a las lipoxigenasas con la correspondiente producción de radicales libres (Thompson, 1988; Paliyath y Droillard, 1992; Thompson y col., 1987). Estos

radicales libres catalizarían las reacciones deteriorativas posteriores que conducen a la muerte celular (Palma y col., 1995).

Es así que, durante el almacenamiento de las berenjenas a 3°C, se observó un incremento muy marcado en la actividad de LOX en las primeras 12 horas que se relaciona con una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados. Además, en ese período se observa que el nivel de peroxidación permaneció prácticamente sin variaciones. A partir del segundo día se registró un aumento de los ácidos grasos poliinsaturados que podría atribuirse a una respuesta del vegetal para contrarrestar el efecto del estrés aplicado, intentando mantener la fluidez de las membranas. Paralelamente, la actividad LOX aumentó así como el grado de peroxidación. El descenso posterior en el nivel de ácidos grasos poliinsaturados resultaría como consecuencia de lo antes descrito.

Por su parte, la concentración de fosfolípidos presentó igualmente una disminución para tiempos cortos de almacenamiento a 3°C seguido de un paulatino ascenso pudiendo atribuirse este comportamiento, también, a un intento del vegetal por mantener la fluidez de la membrana. El pasaje, en general, arrojó valores mayores al de los frutos refrigerados y similares a los correspondientes a 20°C.

El almacenamiento en AMP de berenjenas Black nite retardó la aparición del daño y la evolución del ID que se mantuvo dentro del límite establecido para la comercialización de los frutos (ID = 2,5) aún después de 12 días de conservación refrigerada.

Las diferencias entre el comportamiento de los frutos almacenados en AMP y los frutos testigo se evidenciaron, fundamentalmente, al inicio del almacenamiento. Es así que, en los frutos almacenados en AMP se registró un menor incremento en el contenido de fenoles totales y flavonoides, no se observó el pico inicial en la actividad de LOX ni la disminución inicial en los ácidos grasos poliinsaturados, los que comenzaron a aumentar antes en los frutos tratados. Asimismo, se observó un adelantamiento en el incremento de fosfolípidos lo que contribuiría a mantener la fluidez de la membrana. Estos resultados indicarían que, probablemente, la modificación de la atmósfera contrarrestó parcialmente el efecto del estrés por frío observado a través del ID.

Para tiempos mayores de conservación, si bien la envergadura de los cambios en los frutos almacenados en AMP fue menor, prácticamente no se observaron

diferencias en el comportamiento de los frutos ya que, en ambos casos, el daño se había manifestado.

CONCLUSIONES GENERALES

- En berenjenas Black nite se observó el desarrollo del daño por frío a partir del tercer día de almacenamiento a 3°C. Los síntomas de daño se acentuaron con el pasaje de los frutos a 20°C.
- Los síntomas de daño por frío fueron punteado superficial, aparición de zonas punteadas, decoloración del cáliz, pardeamiento de semillas y pulpa.
- La pérdida de electrolitos fue significativa una vez que los frutos alcanzaron un nivel de daño severo o muy severo. Tanto el almacenamiento como la transferencia de los frutos a 20°C evidenciaron valores de pérdida de electrolitos mayores que a 3°C.
- Se registró un incremento en la concentración de fenoles totales y de flavonoides durante los 3 primeros días de almacenamiento a 3°C de berenjenas Black nite. Los flavonoides constituyeron más del 80% de los fenoles totales.
- La capacidad antiradical en berenjenas Black nite se debió, principalmente, a los compuestos fenólicos ya que no detectó la presencia de ácido ascórbico. Esta aumentó de manera similar a los flavonoides durante el almacenamiento tanto a 3°C como luego del pasaje a 20°C por 48 horas.
- Los principales ácidos grasos que se detectaron en las berenjenas Black nite fueron palmítico, oleico, linoleico y linolénico. El perfil de ácidos grasos se vio influenciado por la temperatura de crecimiento de los frutos siendo mayor la concentración de ácidos saturados y monoinsaturados y menor la de poliinsaturados de los frutos desarrollados a mayor temperatura.

- Se registró un incremento de la actividad específica de LOX durante las primeras horas de almacenamiento de los frutos a 3°C que se reflejó en una disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Se observó un marcado incremento en los mismos luego de 3 días, similar al de los frutos almacenados a 20°C. La concentración de fosfolípidos también presentó una disminución para tiempos cortos de almacenamiento.
- El grado de peroxidación de los lípidos aumentó antes de manifestarse signos visibles de daño por frío en los frutos almacenados a 3°C alcanzándose valores máximos a los 6 días de conservación.
- El almacenamiento en AMP de berenjenas Black nite retardó la aparición del daño siendo menos marcadas las variaciones en las concentraciones de fenoles totales y flavonoides respecto a los frutos testigos.
- La capacidad antioxidante de los frutos conservados en AMP fue menor a la de los frutos testigo para tiempos de almacenamiento iguales y superiores a los 3 días, existiendo una relación positiva entre ésta y los contenidos de fenoles totales y flavonoides. Sin embargo, a los 2 días de conservación se observó un incremento más marcado en los frutos conservados en bolsas de PEBD.
- Los frutos sometidos al tratamiento postcosecha no evidenciaron el aumento inicial en la actividad de LOX ni la disminución inicial en los ácidos grasos poliinsaturados.
- Se observó un adelanto en el incremento de los niveles de fosfolípidos de los frutos tratados que alcanzaron niveles menores al de los frutos testigo al final de la conservación.

BIBLIOGRAFÍA

- Ames, B. N. 1966. Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. En *Methods of Enzimology*. pp. 115-118.
- Anónimo. 2003. www.infoagro.com/hortalizas/berenjena.htm.
- Artés-Hernández, F.; Artés, F.; Tomás-Barberán, F. A. 2003. Quality and Enhancement of Bioactive Phenolics in Cv. Napoleon Table Grapes Exposed to Different Postharvest Gaseous Treatments. *J. Agric. Food Chem.*, 51. pp. 5290-5295.
- Awad, M. A.; Jager, A. 2003. Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 27. pp. 53-58.
- Ayala-Zavala, J. F.; Wang, S. Y.; Wang, C. Y.; González-Aguilar, G. A. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37. pp. 687-695.
- Bartosz, G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant.*, 19 (1). pp. 47-64.
- Beneytour, J. L.; Najid, A.; Tixier, M. 1988. Changes ub lipoxygenase activity during seedling development of *Lupinus albus*. *Plant Sci.*, 58. pp. 35-41.
- Benkeblia, N. 2000. Phenylalanine Ammonia-lyase, Peroxidase, Pyruvic Acid and Total Phenolics Variations in Onion Bulbs During Long-term Storage. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33. pp. 112-116.
- Bergevin, M.; L'Heureux, G. P. L.; Thompson, J. E.; Willemot, C. 1993. Effect of chilling and subsequent storage al 20°C on electrolyte leakage and phospholipid fatty acid composition of tomato pericarp. *Physiologia Plantarum*, 87. pp. 522-527.
- Bergman, M.; Varxhavsky, L.; Gottlieb, H. E.; Grossman, S. 2001. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, 58. pp. 143-152.
- Bernalte, M. J.; Sabio, E.; Hernández, M. T.; Gervasini, C. 2003. Influence of storage delay on quality of "Van" sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 28. pp. 303-312.

- Bishop, D. G. 1986. Chilling sensitivity in higher plants: the role of phosphatidylglycerol. *Plant Cell Environ.*, 9. pp. 613-616.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28. pp. 25-30.
- Cantwell, M. I.; Kasmire, R. F. 2002. Postharvest Handling Systems: Fruit Vegetables. En *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. A. A. Kader Technical Editor. Publication 3311. Agriculture and Natural Resources, University of California. pp. 407-421.
- Cantwell, M. I.; Peiser, G.; Mercado-Silva, E. 2002. Induction of chilling injury in jicama (*Pachyrhizus erosus*) root: changes in texture, color and phenolics. *Postharvest Biology and Technology*, 25. pp. 311-320.
- Cantwell, M.; Suslow, T. V. 2000. Berenjena. Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. Departamento de Productos Vegetales. Universidad de California, Davis, USA. (www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/español/Berenjena.html).
- Carlin, F.; Nguyen-The, C.; Chambroy, Y.; Reich, M. 1990. Effects of controlled atmospheres on microbial spoilage, electrolyte leakage and sugar content of fresh 'ready-to-use' grated carrots. *Int. J. Food Sc. and Technol.*, 25. pp. 110-119.
- Cartaya, O.; Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22 (2). pp. 5 – 14.
- Chan, H. W. S. 1973. Soy-bean lipoxygenase: an iron-containing dioxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 327. pp. 32-35.
- Chen, G.; Hackett, R.; Walker, D.; Taylor, A.; Lin, Z.; Grierson, D. 2004. Identification of a Specific Isoform of Tomato Lipoxygenase (TomloxC) Involved in the Generation of Fatty Acid Derived Flavor Compounds. *Plant Physiol.*, 136. pp. 2641-2651.
- Cheung, L. M.; Cheung, P. C. K. 2005. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89. pp. 403-409.

- Cistola, D. P.; Hamilton, J. A.; Jackson, D.; Small, D. M. 1988. Ionization and phase behaviour of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. *Biochemistry*, 27. pp. 1881-1888.
- Association of Official Analytical Chemists. 1975. *Official Methods of Analysis*, 12^o Ed. AOAC, Washington, DC. pp. 829.
- Swain, T.; Hillis, W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10. pp. 63–68.
- Concellón, A. 2003. Daño por frío en frutos no climatéricos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. CIDCA – UNLP.
- Côté, F.; Thompson, J. E.; Willemont, C. 1993. Limitation to the use of electrolyte leakage for the measurement of chilling injury in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 3. pp. 103-110.
- Dahmer, M. L.; Fleming, P. D.; Collins, G. B.; Hildebrand, D. F. 1989. A rapid screening technique for determining the lipid composition of soybean seeds. *JAOCs*, 66 (4). pp. 543-548.
- Davies, A. R. 1995. Advances in Modified-atmosphere packaging. En *New Methods of Food Preservation*. G. W. Gould Ed. Glasgow, U.K. Blackie. pp. 304-320.
- Del Valle, J. M.; Palma, M. T. 1997. Atmósferas controladas y modificadas. En *Temas en Tecnología de Alimentos*. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. pp. 89 – 130.
- Dixon, R. A.; Lamb, C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40. pp. 339-367.
- Escalona, V. H.; Aguayo, E.; Gómez, P.; Artés, F. 2004. Modified atmosphere packaging inhibits browning in fennel. *Lebensm.-Wiss- u-Technol.*, 37. pp. 115-121.

- Esteban, E. M.; Mollá, E.; Villarroya, M. B.; López-Andréu, F. J. 1989a. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during storage. *Scientia Horticulturae*, 41. pp. 19-25.
- Esteban, R. M.; Mollá, E.; Villarroya, M. B.; López-Andréu, F. J. 1989b. Physical alteration in eggplant fruits during storage at different temperatures. *Journal of Food Science Technology*, 26 (6). pp. 301-303.
- Esteban, R. M.; López-Andréu, F. J.; Martín-Cabrejas, M. A.; Mollá, E. M. 1993. Pectin changes during the development and ripening of eggplant fruit. *Food Chemistry*, 46. pp. 289-292.
- Esteban, R. M.; Mollá, E. M.; Robredo, L. M.; López-Andréu, F. J. 1992. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during development and ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 40. pp. 998-1000.
- Fallik, E.; Temkin-Gorodeiski, N.; Grinberg, S.; Davidson, H. 1995. Prolonged low-temperature storage of eggplants in polyethylene bags. *Postharvest Biology and Technology*, 5. pp. 83-89.
- Fobel, M.; Lynch, D. V.; Thompson, J. E. 1987. Membrane deterioration in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.*, 85. pp. 204-211.
- Furmanski, R. J.; Buescher, R. W. 1979. Influence of chilling on EL and internal conductivity of peach fruit. *Journal of Food Quality*, 11. pp. 253-278.
- Gil, M. I.; Ferrers, F.; Tomás Barberán, A. 1998. Effects of modified atmosphere packaging on the flavonoids and vitamin C content of minimally processed swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). *J. Agric. Food Chem.*, 46. pp. 2007-2012.
- Gil, M. I.; Ferrers, F.; Tomás Barberán, A. 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (6). pp. 2213-2217.
- Grossman, S.; Trop, M.; Avtalion, R.; Pinsky, A. 1972. Egg Plant Lipoxygenase: Isolation and Partial Characterization. *Lipids*, 7. pp. 467-473.

- Guss, P. L.; Macko, V.; Richardson, T.; Stahmann, M. A. 1968. Lipoxidase in early growth of wheat. *Plant. Cell Physiol.*, 9. pp. 514-422.
- Harborne, J. B. 1994. En *Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. J. B. Harbone Ed. Chapman and Hall, London. pp. 589-618.
- Hildebrand, D. F.; Hamilton-Kemp, T. R.; Legg, C. S.; Bookjans, G. 1988. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.*, 7. pp. 201-219.
- Hildebrand, D. F.; Hymowitz, T. 1981. Two Soybean Genotypes Lacking Lipoxygenase – 1. *JACOS*, Mayo. pp. 583 – 586.
- Hodges, D. M.; Forney, Ch. F.; Wismer, W. V. 2001. Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 126 (5). pp. 611-617.
- Husain, S. R.; Cillard, J.; Cillard, P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26. pp. 2489-2491.
- Ingam, D.; Sanders, K.; Kolybaba, M.; López, M. 1997. *Lancet*, 983. pp. 990-994.
- Jha, S. N.; Matsuoka, T. 2002. Surface stiffness and density of eggplant during storage. *Journal of Food Engineering*, 54. pp. 23-26.
- Kader, A. A. 1986. Biochemical and Physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology*, Mayo. pp. 99-104.
- Kader, A. A. 2002a. Postharvest Biology and Technology: An Overview. En *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. A. A. Kader Technical Editor. Publication 3311. Agriculture and Natural Resources. University of California. pp. 39-47.
- Kader, A. A. 2002b. Modified Atmospheres during Transport and Storage. En *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. A. A. Kader Technical Editor. 3° Edición. Publication 3311. Agriculture and Natural Resources. University of California. pp. 135-144.

- Kader, A. A.; Zagory, D.; Kerbel, E. L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 28. pp. 1-30.
- Keppler, L. D.; Novacky, A. 1986. Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathology*, 76. pp. 104-108.
- King, M. M.; Ludford, P. M. 1983. Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of different tomato cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 108. pp. 74-77.
- Kozukue, N.; Kozukue, E.; Kishiguchi, M. 1979. Changes in the contents of phenolic substances, phenylalanine, ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) accompanying chilling-injury of eggplant fruit. *Scientia Horticulturae*, 11. pp. 51-59.
- Kramer, G. F.; Wang, C. Y. 1990. Effects of chilling and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini squash. *J. Plant. Physiol.*, 136. pp. 115-119.
- Kuo, S. J.; Parkin, K. L. 1989. Chilling injury in Cucumbers (*Cucumis sativa* L.) associated with Lipid Peroxidation as measured by Ethane Evolution. *Journal of Food Science*, 54. pp. 1488-1491.
- Kuribayashi, T.; Kaise, H.; Uno, C.; Hara, T.; Hayakawa, T.; Joh, T. 2002. Purification and characterization of Lipoxigenase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Agric. Food Chem.*, 50. pp. 1247-1253.
- Larkindale, J.; Huang, B. 2004. Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*, 51. pp 57–67.
- Larrigaudiere, C.; Lentheric, I.; Vendrell, M. 1998. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled-atmosphere stored pears. *J. Sci. Food Agric.*, 78. pp. 232-236.
- Leja, M.; Mareczek, A.; Starzynska, A.; Rozek, S. 2001. Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. *Food Chemistry*, 72. pp. 219-222.

- Leja, M.; Rozek, S.; Myczkowski, J. 1994. The effect of fertilization with different forms of nitrogen on greenhouse lettuce quality and its changes during storage. III. Phenolic metabolism. *Folia Hort.*, VI (1). pp. 63-72.
- Leshem, Y. Y. 1992. *Plant Membranes: A Biophysical Approach to Structure, Development and Senescence*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lieberman, M.; Craft, C. C.; Audia, W. V.; Wilcox, M. S. 1958. Biochemical Studies of chilling injury in sweet potatoes. *Plant Physiol.*, 33 (5). pp. 307-311.
- Lopez-Andréu, F. J.; Mollá, E.; Fernández, M.; Esteban, R.M. 1988. Conservación en frío de berenjenas. Modificaciones de su calidad. *Alimentaria*, 192. pp. 31-36.
- López-Nicolás, J. M.; Pérez- Gilabert, M.; García Carmona, F. 2001. Eggplant Lipoygenase (*Solanum melongena*): Product Characterization and Effect of Physicochemical Properties of Linoleic Acid on the Enzymatic Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49. pp. 433-438.
- Lowry, O. H.; Resebrough, H. J.; Farr, A. L.; Readell, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193. pp. 136-139.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14. pp. 257-269.
- Lurie, S.; Laamim, M.; Lapsker, Z.; Fallik, E. 1997. Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiol. Plant.*, 100. pp. 297-302.
- Lurie, S.; Sabehat, A. 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 11. pp. 57-62.
- Lyons, J. M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 24. pp. 445-466.
- Lyons, J. M.; Breidenbach, R. W. 1987. Chilling injury. En *Postharvest Physiology of Vegetables*. J. Weichmann Editor. Marcel Dekker, New York.
- Lyons, J. M.; Raison, J. K. 1970. Oxidative activity if mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.*, 45. pp. 386-389.

- Lyons, J. M.; Raison, J. K.; Steponkus, P. L. 1979. The plant membrane in response to low temperature: an overview. En *Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane*. J. M. Lyons; D. Graham; J. K. Raison Editors. Academic Press Inc. pp. 1-24.
- Mangione, J. L.; Sánchez, M. G. 1999. Cultivo y manejo poscosecha de berenjena. Inspección de frutas y hortalizas. Laboratorio de Fitopatología. Corporación Mercado Central Buenos Aires. (www.mercadocentral.com.ar/site2001/tecnicas/berenjena.zip).
- Marangoni, A. G.; Butuner, Z.; Smith, J. L.; Stanley, D. W. 1990. Physical and biochemical changes in the microsomal membranes of tomato fruit associated with acclimation to chilling. *J. Plant Physiol.*, 135. pp. 653-661.
- Marangoni, A. G.; Palma, T.; Stanley, D. W. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*, 7. pp. 193-217.
- Marangoni, A. G.; Smith, A. K.; Yada, R. Y.; Stanley, D. W. 1989. Ultrastructural changes associated with chilling injury in mature green tomato fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 114. pp. 958-962.
- Matsui, K.; Kajiwara, T.; Hayashi, K.; Hatanaka, A. 1988. Tissue specific heterogeneity of lipoxygenase in cucumber seedlings. *Agric. Biol. Chem.*, 52. pp. 3219-3221.
- Mazliak, P. 1987. Membrane changes and consequences for the postharvest period. En *Postharvest Physiology of Vegetable*. J. Weichmann Editor. Academic Press, Inc. pp. 1-50 y 95-111.
- Mazza, G.; Miniati, E. 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mc Kersie, B. D. 1996. Chilling Stress. <http://cropsoil.psu.edu/Courses/AGRO518/CHILLING.htm>.
- Meir, S.; Philosoph-Hadas, S.; Aharoni, N. 1992. Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117 (1). pp. 128-132.

- Meir, S.; Naiman, D.; Akerman, M.; Hyman, J. Y.; Zauberman, G.; Fuchs, Y. 1997. Prolonged storage of 'Has' avocado fruit using modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 12 (1). pp. 51-60.
- Minorsky, P. V. 1985. An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. *Plant Cell Environ.*, 8. pp. 75-94.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9). pp. 405-410.
- Molinar, R.; Trejo, E.; Cantwell, M. 1996. The Development of Chilling Injury in Three Types of Eggplants. Research Summary. UC Cooperative Extension, Fresno Country and Dept. Vegetable, University of California, Davis, CA. pp. 1-16.
- Mollá, E.; Esteban, R. M.; Cisneros, M. D.; López-Andréu, F. J. 1990. Evolución del color durante el desarrollo de frutos de berenjena. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 30 (4). pp. 492-499.
- Murata, T.; Tatsumi, Y. 1979. Ion leakage in chilled plant tissues. En *Low Temperature Stress in Crop Plants*. J.M. Lyons; D. Graham y J. K. Raison Editores. Academic Press. New York, pp. 141.
- Nakamura, R.; Inaba, A.; Ito, I. 1985. Effect of cultivating conditions and postharvest stepwise cooling on the chilling sensitivity of eggplant and cucumber fruit. *Sci. Prt.*, Okayama Univ., Japón, 66. pp. 19-29.
- Nakayama, T.; Takeura, Y.; Ueda, T. 1995. Visible Spectrophotometric Assay, Purification and Molecular Properties of a Lipoxygenase from Eggplant (*Solanum melongena* Linne) Fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214 (3). pp. 1067-1072.
- Nguyen, X. V.; Mazliak, P. 1990. Chilling injury induction is accompanied by galactolipid degradation in tomato pericarp. *Plant Physiol. Biochem.*, 28. pp. 283-291.

- Norman, H. A.; Krizek, D. T.; Mirecki, R. M. 2001. Changes in membrane lipid and free fatty acid composition during low temperature preconditioning against SO₂ injury in coleus. *Phytochemistry*, 58. pp. 263–268.
- Oelze-Karow, H.; Schopfer, P.; Mohr, H. 1970. Phytochrome-mediated repression of enzyme synthesis (lipoxygenase: a threshold phenomenon). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65. pp. 51-57.
- Ohta, H.; Ida, S.; Mikami, B.; Morita, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol.*, 27. pp. 911-918.
- Paliyath, G.; Droillard, M. J. 1992. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol. Biochem.*, 10. pp. 789-812.
- Palma, T.; Marangoni, A. G.; Stanley, D. W. 1995. Environmental stresses affect tomato microsomal membrane function differently than natural ripening and senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 6. pp. 257-273.
- Pantástico, E. B; Matoo, A. K.; Murata, T.; Ogata, K. 1979. Desórdenes y Enfermedades Fisiológica. En *Fisiología de la Postrecolección, Manejo y Utilización de Frutas y Hortalizas Tropicales y Subtropicales*. Er. B. Pantastico Editor. Continental S.A. México. pp. 407.
- Parkin, K. L.; Kuo, S. J. 1989. Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv. Hybrid C) fruit. *Plant Physiol.*, 90. pp. 1049-1056.
- Parkin, K. L.; Marangoni, A. G.; Jackman, R. L.; Yada, R. Y.; Stanley, D. W. 1989. Chilling injury. A review of possible mechanisms. *J. Food Biochem.*, 13. pp. 127-153.
- Pérez-Ilzalbe, J.; Hernández, T.; Estrella, I.; Vendrell, M. 1997. Cold storage of apples (cv. Granny Smith) and changes in phenolic compounds. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 204. pp. 52-55.
- Pesis, E.; Aharoni, D.; Aharon, Z.; Ben-Aire, R.; Aharoni, N.; Fuchs, Y. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 10. pp. 93-101.

- Phakawatmongkol, W.; Ketsa, S.; Van Doorn, W. G. 2004. Variation in fruit chilling injury among mango cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 32. pp. 115-118.
- Phillips, C. A. 1996. Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *Int. J. Food Science and Technol.*, 31. pp. 463-479.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63. pp. 1035-1042.
- Pietta, P. G.; Simonetti, P. 1999. En *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. L. Packer; M. Hiramatsu; T. Yoshikawa Editors. Academic Press, San Diego. pp. 283-308.
- Pinsky, A.; Grossman, S.; Trop, M. 1971. Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 36. pp. 571-572.
- Piretti, M. V.; Gallerani, G.; Pratella, G. C. 2004. Polyphenol fate and superficial scald in Apple. *Postharvest Biology and Technology*, 4. pp. 213-224.
- Pistorius, W. K.; Axelrod, B.; Palmer, G. 1974. Iron, an essential component of lipoxygenase. *J. Biol. Chem*, 249. pp. 3183-3186.
- Purvis, A. C. 2002. Diphenylamine reduces chilling injury on green bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25. pp. 41-48.
- Purvis, A. C; Shewfelt, R. L.; Gegogei, J. W. 1995. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiol. Plant.*, 94. pp. 743-749.
- Pyo, Y. H.; Lee, T. C.; Logendra, L.; Rosen, R. T. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) extracts. *Food Chemistry*, 85. pp. 19-26.
- Raison, J. K. 1980. Membrane Lipids: Structure and Function. En *The Biochemistry of Plants*. Vol. 4. Academic Press Inc. pp. 57- 82.
- Raison, J. K.; Orr, G. R. 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. En *Chilling Injury of Horticultural Crops*. C. Y. Wang Editor. CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 145-164.

- Raison, J. K.; Lyons, J. M. 1986. Chilling injury: a plea for uniform terminology. *Plant Cell Environmental*, 9. pp. 685 - 692.
- Ranjan, J. K.; Chakrabarti, A. K. 2002. Biochemical Changes during fruit development in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 21. pp. 93-95.
- Rhodes, M. J. C.; Wooltorton, L. S. C.; Hill, A. C. 1981. Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. En *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. J. Friend & M. J. C. Rhodes Editors. Academic Press Inc. London. pp. 193-220.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. 1996. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7). pp. 933-956.
- Ridolfi, M.; Terenziani, S.; Patumi, M.; Fontanazza, G. 2002. Characterization of the Lipoxygenases in some Olive Cultivars and Determination of their Role in Volatile Compounds Formation. *J. Agric. Food. Chem.*, 50. pp. 835-839.
- Roberts, W. G.; Gordon, M. H. 2003. Determination of the Total Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables by Liposome Assay. *J. Agric. Food. Chem.*, 51. pp.1489-1493.
- Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits – effect of environmental and variety on composition. *Food Chemistry*, 64 (4). pp. 401-436.
- Rodríguez, S. del C. 2000. Cambios fisiológicos en berenjenas (*Solanum melongena*) relacionados con el daño por frío. Efecto de la aplicación de tratamientos físicos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
- Ryall, A. Ll.; Lipton, W. J. 1983. Solanaceous Crops: Potato, Tomato, Pepper, Eggplant. En *Handling, Transportation and Storage of Fruits and Vegetables*. AVI Publishing Co., Westport, Conn. 2° Ed. Vol. I. pp. 240-247.

- Sabehat, A.; Weiss, D.; Lurie, D. 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiol.*, 110. pp. 531-537.
- Sakamoto, T.; Higashi, S.; Wada, H.; Murata, N.; Bryant, D. A. 1997. Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *FEMS Microbiology Letters*, 152. pp. 313-320.
- Saltveit, M. E. 2002. The rate of ion leakage from chilling-sensitive tissue does not immediately increase upon exposure to chilling temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 26. pp. 295-304.
- Saltveit, M. E. 2003a. Temperature Extremes. En: *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. J. A. Bartz; J. K. Brecht Editors. Marcel Dekker, Ink. NY. pp. 457-489.
- Saltveit, M. E. 2003b. Is it possible to find an optimal controlled atmosphere? *Postharvest Biology and Technology*, 27. pp. 3-13.
- Saltveit, M. E.; Morris, L. L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. En *Chilling Injury of Horticultural Crops*. C. Y. Wang Editor. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3-15.
- Salunkhe, D. K.; Desai, B. B. 1984. Eggplant. En *Postharvest Biotechnology of Vegetables*, Vol. II. CRC Press. pp. 39 – 47.
- Sarkar, H. N.; Hasan, M. A.; Chatiopadhyay, P. K. 1997. Influence of polyethylene packaging on the post-harvest storage behavior of banana fruit. *Horticultural Journal*, 10 (1). pp. 31-39.
- Schilstra, M. J.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G. 1993. Kinetic analysis of the induction period in lipoxygenase catalysis. *Biochemistry*, 32. pp. 7686-7691.
- Scott, K. J.; Chaplin, G. R. 1978. Reduction of chilling injury in avocados stored in sealed polyethylene bags. *Trop. Agric. Trinidad*, 55. pp. 87-90.

- Shewfelt, R. L. 1993. Measuring quality and maturity. En *Postharvest Handling. A systems Approach*. R. L. Shewfelt; S. E. Prusia Editors. Academic Press, Inc. pp. 111.
- Shewfelt, R. L.; Erickson, M. E. 1991. Role of lipid peroxidation in the mechanism associated disorders in edible plant tissue. *Trends in Food Science Technology*, 2. pp. 152-154.
- Siedow, J. N. 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42. pp. 145-488.
- Sigrist, J. M. M. 1984a. Distúrbio pelo frio en berinjelas (*Solanum melongena* L.): I. Efeitos da exposição contnua temperaturas constantes nas taxas de deterioração e respiração dos frutos. *Col. ITAL*, Campinas,14. pp. 151-164.
- Sigrist, J. M. M. 1984b. Distúrbio pelo frio en berinjelas (*Solanum melongena* L.): II. Efeitos da exposição a temperaturas que causam o distúrbio e da subsequente transferencia a temperatura ambiente (20°C) nas taxas de deterioração, respiração e produção de etileno dos frutos. *Col. ITAL*, Campinas,14. pp. 165-190.
- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71. pp. 522-525.
- Singer, S. J.; Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science*, 175. pp. 720.
- Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. En *Environment and plant metabolism: Flexibility and acclimation*. N. Smirnoff Editor. Oxford. Bios Scientific Publishers. pp. 243-317.
- Soler-Rivas, C.; Espin, J. C.; Wichers, H. J. 2000. An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs. *Phytochem. Anal.*, 11. pp. 330-338.
- Stanley, D. W. 1991. Biological Membrane Deterioration and Associated Quality Losses in Food Tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30 (5). pp. 487 - 553.

- Starzyriska, A.; Leja, M.; Mareczek, A. 2003. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. *Plant Science*, 165. pp. 1387-1395.
- Suurmeijer, C. N. S. P.; Pérez-Gilabert, M.; van der Hijden, H. T. W. M.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G. 1998. Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. *Plant Physiol. Biochem.*, 36 (9). pp. 657-663.
- Thompson, J. E. 1984a. Physical changes in the membrane response to environmental stress. En *Frontiers of membrane research in agriculture*. J. B. St. John; E. Berlin; P. C. Jackson Editors. Rowman & Allanheld, Totowa, N.J. pp. 347-358.
- Thompson, J. E. 1984b. Physiology of Membrane Fluidity. Vol. 2. M. Shinitzky Editor. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 85-108.
- Thompson, J. E. 1988. The molecular basis for membrane deterioration during senescence. En *Senescence and Aging in Plants*. L. D. Nooden y A. C. Leopold Editors. Academic Press, San Diego, California. pp. 51-83.
- Thompson, J. E.; Legge, R. L.; Barber, R. F. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.*, 105. pp. 317.
- Thompson, J. F.; Mitchan, E. J.; Mitchell, F. G. 2002. Preparation for Fresh Market. En *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. A. A. Kader. Technical Editor. 3^o Ed. Publication 3311. Agriculture and Natural Resources. University of California. pp. 67-79.
- Tian, S. P.; Jiang, A. L.; Xu, Y.; Wang, Y. S. 2004. Responses of physiology and quality of sweet cherry fruit to different atmospheres in storage. *Food Chemistry*, 87. pp. 43-49.
- Todd, J. F.; Paliyath, G.; Thompson, J. E. 1992. Effect of chilling on the activities of lipid degrading enzymes in tomato fruit microsomal membranes. *Plant Physiol. Biochem.*, 30 (5). pp. 517 – 522.

- Vick, B. A.; Zimmerman, D. C. 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.*, 75. pp. 458-461.
- Wade, N. L. 1979. Physiology of cool-storage disorders of fruit and vegetables. En *Low temperature stress in crop plants: The role of the membrane*. J. M. Lyons; D. Graham; J. K. Raison Editors. Academic Press Inc. pp. 81-96.
- Wang, C. Y. 1989. Chilling injury of fruit and vegetables. *Food Rev. Internatl.*, 5. pp. 209-236.
- Wang, C. Y. 1991. Effect of abscisic acid on chilling injury of zucchini squash. *J. Plant Growth Regulation*, 10. pp. 101-105.
- Wang, C. Y. 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Horticultural Reviews*, 15. pp. 63-95.
- Wang, C. Y. 1995a. Temperature preconditioning affects glutathione content and glutathione reductase activity in chilled zucchini squash. *J. Plant Physiol.*, 145. pp. 148-152.
- Wang, C. Y. 1995b. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, 5. pp. 67-76.
- Wang, C. Y. 1996. Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, 8. pp. 29-36.
- Wang, C. Y.; Buta, J. G. 1994. Methyl jasmonate reduces chilling injury in Cucurbita pepo through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. *Environmental and Experimental Botany*, 34 (4). pp. 427-432.
- Wang, C. Y.; Kramer, G. F.; Whitaker, B. D.; Lusby, W. R. 1992. Temperature Preconditioning increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in zucchini squash. *J. Plant Physiol.*, 140. pp. 229-235.
- Wang, C. Y.; Qi, L. 1997. Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers. *Postharvest Biology and Technology*, 10. pp 195-200.

- Wardowsky, W. F.; Grierson, W.; Edwards, G. J. 1973. Chilling injury of stored limes and grape fruits as affected by differently permeable packaging film. *Hort. Sci.*, 8. pp. 173-175.
- Watada, A. E.; Abe, K.; Yamauchi, N. 1990. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Technology*, 5. pp. 116-122.
- Whitaker, B. D. 1991b. Growth conditions and ripening influence plastid and microsomal membrane lipid composition in bell pepper fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116 (3). pp. 528-533.
- Whitaker, B. D. 1991a. Changes in lipids of tomato fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Phytochemistry*, 30 (3). pp. 757-761.
- Whitaker, B. D. 1992. Changes in galactolipid and phospholipid levels of tomato fruits stores at chilling and nonchilling temperatures. *Phytochemistry*, 31 (8). pp. 2627-2630.
- Whitaker, B. D. 1993. Lipid changes in microsomes and crude plastid fractions during storage of tomato fruits at chilling and nonchilling temperature. *Phytochemistry*, 32 (2). pp. 265-271.
- Whitaker, B. D. 1994. Lipid changes in mature-green tomatoes during ripening, during chilling, and after rewarming subsequent to chilling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119 (5). pp. 994-999.
- Whitaker, B. D. 1995. Lipid changes in mature-green bell pepper fruit during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling. *Physiologia Plantarum*, 93. pp. 683-688.
- Whitaker, B. D. 2003. Chemical and Physical Changes in Membranes. En: *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. J. A. Bartz; J. K. Brecht Editors. Marcel Dekker Ink. NY. pp. 457-489.
- Whitaker, B. D.; Wang, C. Y. 1987. Effect of paclobutrazol and chilling on leaf membrane lipids in cucumber seedlings. *Physiol. Plant.*, 70. pp. 404-411.

- Wills, R.; Mc Glasson, B.; Graham, D.; Joyce, D. 1998. *Postharvest. An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables, and Ornamentals*. University of New South Wales Press Ltd. Sydney. Australia.
- Woods, F. M.; Garner, J. O. Jr.; Silva, J. L.; Phromtong, C. 1991. Estimation of chilling sensitivity in leaves of sweet potato by chlorophyll fluorescence and electrolyte leakage. *Phyton*, 52. pp. 33-37.
- Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. 2001. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123. pp. 1173-1183.
- Yang, B.; Shiping, T.; Hongxia, L.; Jie, Z.; Jiankang, C.; Yongcai, L.; Weiyi, Z. 2003. Effect of temperature on chilling injury, decay and quality of Hami melon during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 29. pp. 229-232.
- Yang, Y. J.; Lee, K. A. 1997. Physiological characteristics of chilling injury and CA effect on its reduction during cold storage of pepper fruit. *Journal of the Korean Society for Horticultural Sciences*, 38 (5). pp. 478-482.
- Zagory, D.; Kader, A. A. 1988. Modified Atmosphere Packaging of Fresh Produce. *Food Technology*, Sep. pp. 70-77.
- Zhishen, J. Mengcheng, T. Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxido radicals. *Food Chemistry*, 64. pp. 555-559.
- Zhuang, H.; Barth, M. M.; Hildebrand, D. F. 1994. Packaging influenced total chlorophyll, soluble protein, fatty acid composition and lipoxygenase activity in broccoli florets. *Journal of Food Science*, 59 (6). pp. 1171-1174.
- Zhuang, H.; Hildebrand, D. F.; Barth, M. M. 1997. Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 10. pp. 49-58.

