

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Fac. Ciencias Exactas**  
**Departamento de Química**  
**Departamento de Cs. Biológicas**



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

# *Daño por frío en frutos no-climatéricos*

Tesis Doctoral - 2003

**Analía Concellón**

TESIS  
1975

**Director:** Alicia Raquel Chaves

**Co-Director:** María Cristina Añón

**Lugar de trabajo:** Centro de  
Investigación y Desarrollo en  
Criotecnología de Alimentos  
(CIDCA) - CONICET - Fac. Cs.  
Exactas, UNLP:

## **Datos Personales**

### **Dirección laboral**

Calles 47 y 116  
(1900) - La Plata  
Buenos Aires, Argentina

Telefax: (0221) 490 0741 / 490 0742

975

.....

Fecha 28-04-03

Inv. N° ..... Inv. N° B.57072


El presente trabajo de *Tesis Doctoral*  
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 -CIDCA-, Fac. Cs. Exactas, UNLP,  
bajo la dirección de la Dra. Alicia R. Chaves  
y codirección de M. Cristina Añon.



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

TESIS  
No 975

DONACION.....  
A.....  
Fecha 28-04-03.....  
Inv. B..... Inv. B. 57012

*A Fytta y Coco*

*A Javier y Lauti*

*... Gracias a ellos este trabajo de Tesis pudo llegar a su fin y hacerse realidad...*

*... A mi Directora Alicia R. Chaves, por su apoyo, por su confianza para realizar este trabajo, por su predisposición para enseñarme a transitar por el camino de la investigación.*

*... A mi Codirectora M. Cristina Añón, por su apoyo, por su experiencia de la que aprendí mucho.*

*... A CONICET, por otorgarme las distintas becas con las cuales pude llevar a cabo el trabajo de Tesis.*

*... A Lorenza y Ariel, con quienes compartí triunfos y dificultades, por su apoyo incondicional, por su colaboración y experiencia, por su amistad, por estar ahí cuando los necesité.*

*... A Gustavo y Marcos, por las innumerables consultas que respondieron, por su experiencia, por su apoyo.*

*... A Mercedes y Sonia, por su ayuda incondicional, por las charlas compartidas, por su amistad.*

*... A Alicia M., Alejandro y Ricardo, por sus colaboraciones varias.*

*... A Verónica, Exciquel y Silvina, por su ayuda en los momentos en que el tiempo apremiaba.*

*... A Néstor y Mario, por permitir la usurpación de su lugar con nuestras cosas, por dar esa cuota de humor cada día.*

*... A Anita, Paula, Isabel, Adriana M., Alejandra Q., Francisco, Martín y Fernando, por su colaboración en las cosas de cada día, por los momentos compartidos, por su amistad.*

*... Al Tortu, por su apoyo, por su predisposición a ayudarme en lo que necesité, por el buen humor que contagia.*

*... A Pablo, el Ruso, Nelly, José Luis y Caffa, por su ayuda en los momentos en que los inconvenientes surgían sin avisar.*

*... A Natalia, Estrella, Sara, Diana y Ana Laura, por hacer más fácil el trabajo de todos.*

*... A todos mis compañeros del CIDCA, que de distintas maneras me enseñaron y ayudaron en mi trabajo, por su compañerismo.*

... *A Alicia Canepa*, por sus innumerables consejos, por su ayuda, por su permanente disposición ante mis consultas, por sus palabras de aliento.

... *A Patricia A., Cecilia M., Mecha, Pedro C.*, por su apoyo, por su ayuda y predisposición a colaborar con mis cosas.

... *A mis compañeros de Cátedra de Química Orgánica I*, por escucharme hablar de la Tesis muy a menudo, por su amistad.

... *A Fytta y Coco*, mis padres, por todo el esfuerzo que hicieron para que mis estudios fueran posibles, por su amor y palabras de aliento en los momentos más necesarios, por las encomiendas cargadas de cositas hechas con amor y dulzuras varias.

... *A Noriela, Juan José y Hugo*, mis hermanos, por compartir conmigo cada momento, por alentarme, por ayudarme en todo, por su amor.

... *A Javier*, mi esposo, por ayudarme en todo y en especial en los momentos en los que escribí esta Tesis, por la contención invaluable, por enseñarme a tener calma, por sus palabras, por su amor.

... *A Lauti*, mi hijo, por aparecer en un momento muy especial para mí, por dejarme descansar a la noche, por la música de sus risas, por ser una personita tan importante para mí.

... *A Matilde*, por seguir consintiéndome como cuando era pequeña, por sus dulzuras, por su cariño de siempre.

... *A Norma y Miguel*, mis suegros, por ayudarme con Lauti y así poder escribir tranquila esta Tesis.

... *A mi familia toda*, por su apoyo, por su cariño.

---

## RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se estudió el desarrollo del daño por frío en berenjenas Money Maker N°2, su relación con distintos aspectos fisiológicos y se analizaron tratamientos poscosecha tendientes a minimizar dicho daño. Se almacenaron los frutos en bolsas de LDPE perforada a temperaturas de 0, 5 y 10°C durante un período máximo de 15 días. Si bien la temperatura de 10°C no causó daño por frío, a 0 y 5°C los síntomas de daño comenzaron a ser notorios a partir de los días 5-6 y 9-10, respectivamente. La zona de la piel debajo del cáliz resultó ser aquella que sufrió en primera instancia y con mayor intensidad el daño por frío. A 0 y 5°C los síntomas de daño externo (pérdida de brillo, punteado y escaldaduras) se correspondieron con variaciones en los parámetros de color y contenido de antocianinas. A estas temperaturas, el avance de los síntomas de daño interno (pardeamiento de semillas y pulpa) se correspondió con menores valores de luminosidad de la pulpa ( $L_0$ ), mayor pérdida de electrolitos y alteraciones a nivel ultraestructural observados por microscopía electrónica. A nivel bioquímico, la ruta biosintética del etileno (contenidos de ACC, MACC y etileno interno) se incrementó en respuesta al estrés causado por el almacenamiento de los frutos a 0°C. Sin embargo, el aumento del daño por frío a nivel celular provocó la disminución de dichos contenidos. La actividad de la enzima PPO fue alta cuando la pulpa del fruto no presentaba pardeamiento, pero disminuyó frente al aumento de éste en la pulpa.

Finalmente se almacenaron frutos empleando atmósfera modificada pasiva (AMP), siendo el empaquetamiento con la película PD941 aquel que logró mejorar la calidad y retardar el daño por frío de los frutos, respecto del empaquetado con la película perforada; aunque presentó un ligero desarrollo fúngico en los extremos del cáliz. Dicho inconveniente se logró eliminar cuando los frutos fueron sumergidos en una solución de 1000 ppm del fungicida procloraz y posterior empaquetado en AMP. También se ensayaron tratamientos como inmersión en metil jasmonato  $10^{-5}M$  y calentamiento en estufa a 40°C por 2 h en combinación con el empaquetado en AMP, los cuales retardaron tanto el daño por frío como el desarrollo fúngico, siendo más efectivo el tratamiento térmico.

---

## ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Acido absícico	<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>ACC</b>	Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>ACCo</b>	ACC oxidasa	<b>PPO</b>	Polifenoloxidasa
<b>AJ</b>	Acido jasmónico	<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirrolidona
<b>AMA</b>	Atmósfera modificada activa	<b>R</b>	Resultados
<b>AMP</b>	Atmósfera modificada pasiva	<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>C</b>	Carbono	<b>SC</b>	Salida de cámara
<b>CAT</b>	Catalasa	<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>Cr</b>	Croma	<b>SOD</b>	Superoxido dismutasa
<b>CG</b>	Cromatografía gaseosa	<b>TT</b>	Tratamiento térmico
<b>4-MC</b>	4-metilcatecol	<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno		
<b>GR</b>	Glutación reductasa		
<b>ID</b>	Indice de daño		
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis		
<b>L<sub>0</sub></b>	Pardeamiento de la pulpa		
<b>ΔL</b>	Potencial de oxidación		
<b>LDPE</b>	Polietileno de baja densidad		
<b>MDA</b>	Malondialdehído		
<b>MACC</b>	Malonil-ACC		
<b>MyM</b>	Materiales y métodos		
<b>MJ</b>	Metil Jasmonato		
<b>Met</b>	Metionina		
<b>MyM</b>	Materiales y métodos		
<b>ND</b>	No detectable		
<b>P<sub>CO2</sub></b>	Permeabilidad al dióxido de carbono		
<b>P<sub>O2</sub></b>	Permeabilidad al oxígeno		
<b>PAL</b>	Fenilalanina amonioliasa		
<b>PC</b>	Pirocatecol		

---

# CONTENIDO

## INTRODUCCION GENERAL

<b>GENERALIDADES DE BERENJENA</b>	<b>1</b>
1. Antecedentes	1
2. Propiedades y valor nutritivo	2
3. Exigencias para su crecimiento	2
a) Temperatura	2
b) Humedad	3
c) Luminosidad	3
d) Suelo	3
4. Variedades	4
5. Estacionalidad	5
6. Producción y consumo	5
7. Cosecha	7
8. Almacenamiento poscosecha	7
a) Temperatura óptima y humedad relativa	7
b) Atmósferas controladas y humidificadas	8
c) Sensibilidad al etileno	8
d) Enfermedades	9
9. Daño por frío	9

## OBJETIVOS

### CAPITULO I

#### EVOLUCION DEL DAÑO POR FRÍO EN BERENJENAS

<b>I - INTRODUCCION</b>	<b>10</b>
<b>I - 1. DAÑO POR FRIO EN FRUTOS Y HORTALIZAS</b>	<b>10</b>
I - 1.1. Tipos de daño	10
I - 1.2. Condiciones que inducen daño por frío	11
I - 1.2.1. Temperatura	11
I - 1.2.2. Tiempo de exposición	11
I - 1.3. Fisiología del daño por frío	12
I - 1.3.1. Mecanismo del daño por frío	12
I - 1.3.1.1. Teoría de la transición de fase	13
I - 1.3.1.2. Adaptación de las membranas al estrés por bajas temperaturas	15
I - 1.3.2. Alteraciones de la respiración por las bajas temperaturas	15
I - 1.3.3. Cambios en la concentración de los metabolitos	16
<b>I - 2. RESPIRACIÓN EN FRUTOS Y HORTALIZAS</b>	<b>16</b>
I - 2.1. Fundamentos fisiológicos de la respiración	16
I - 2.1.2. Patrón climatérico	17
I - 2.1.3. Patrón no-climatérico	20
<b>I - OBJETIVO</b>	<b>21</b>
<b>I - MATERIALES Y METODOS</b>	<b>22</b>
I - 1. Material vegetal y almacenamiento	22
I - 2. Observaciones sensoriales y cálculo del índice de daño	22
I - 3. Evaluación de la pérdida de peso	23
I - 4. Pardeamiento de la pulpa	23
I - 5. Evaluación del potencial de oxidación	24
I - 6. Determinación de la pérdida de electrolitos por parte del tejido	24
I - 7. Medida de la acidez ionica	24



---

I - 8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	25
I - 9. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	25
I - 10. Análisis estadístico	26
<b>I - RESULTADOS</b>	27
I - 1. Pérdida de peso durante el almacenamiento refrigerado	27
I - 2. Evolución del daño por frío	27
I - 3. Evolución del pardeamiento de la pulpa	32
I - 4. Cambios en el potencial de oxidación	33
I - 5. Cambios en la pérdida de electrolitos	34
I - 6. Variación de la acidez iónica	35
I - 7. Análisis por microscopía	36
<b>I - DISCUSION</b>	42
<b>I - CONCLUSIONES</b>	44

## CAPITULO II

### BIOSINTESIS DE ETILENO FRENTE AL ESTRES PROVOCADO POR LAS BAJAS TEMPERATURAS

<b>II - INTRODUCCION</b>	45
<b>II - 1. PRODUCCIÓN DE ETILENO</b>	45
II - 1.1. ¿Cuándo se descubrió el etileno?	45
II - 1.2. Biosíntesis del etileno	46
II - 1.3. Etileno: señal y percepción	49
II - 1.4. Inhibición en la producción de etileno	50
II - 1.5. Variación del contenido de ACC y producción de etileno en la maduración	51
II - 1.6. Regulación en la producción de etileno inducida por estrés	52
II - 1.7. Usos del etileno y efectos no deseados	53
<b>II - 2. Técnicas y manejo del etileno en poscosecha</b>	53
II - 2.1. Efectos nocivos del etileno en poscosecha	53
II - 2.2. Efectos benéficos del etileno en poscosecha	53
<b>II - OBJETIVO</b>	54
<b>II - MATERIALES Y METODOS</b>	55
II - 1. Material vegetal y almacenamiento	55
II - 2. Observaciones sensoriales	55
II - 3. Pérdida de electrolitos por parte del tejido	56
II - 4. Determinación del contenido de etileno	56
II - 4.1. Obtención de la muestra gaseosa	56
II - 4.2. Cuantificación por CG	56
II - 5. Contenido de ACC	57
II - 5.1. Extracción	57
II - 5.2. Determinación	57
II - 6. Contenido de MACC	57
II - 6.1. Extracción	57
II - 6.2. Determinación	58
II - 7. Actividad <i>in-vivo</i> de ACCo	58
II - 8. Análisis estadístico	59
<b>II - RESULTADOS</b>	60
II - 1. Evolución del daño por frío	60
II - 2. Cambios en la pérdida de electrolitos	60
II - 3. Contenido de etileno interno durante el almacenamiento	60
II - 4. Actividad <i>in-vivo</i> de ACCo	62
II - 5. Contenido de ACC	63
II - 6. Contenido de MACC	64
<b>II - DISCUSIÓN</b>	65
<b>II - CONCLUSIONES</b>	67

---

**CAPITULO III**  
**VARIACION DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS Y EL COLOR EN BERENJENAS**  
**DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

III - INTRODUCCIÓN	68
III - 1. CAMBIOS DE COLOR EN FRUTOS Y VEGETALES	68
III - 1.1. Antocianinas	68
III - 1.1.1. Origen bioquímico	68
III - 1.1.2. Química y transformación estructural	69
III - 1.1.3. Estabilización y aumento del color	71
III - 1.1.4. Biosíntesis	72
III - 1.1.5. Actividad antioxidante	73
III - OBJETIVO	74
III - MATERIALES Y MÉTODOS	75
III - 1. Material vegetal y almacenamiento	75
III - 2. Observaciones sensoriales y cálculo del índice de daño	75
III - 3. Determinación del color superficial	76
III - 4. Contenido de antocianinas	76
III - 4.1. Extracción	76
III - 4.2. Determinación	76
III - 5. Análisis estadístico	77
III - RESULTADOS	78
III - 1. Evolución del daño por frío	78
III - 2. Determinación del contenido de antocianinas	78
III - 2.1. Puesta a punto de la técnica de extracción y determinación	78
III - 2.2. Color superficial de berenjenas	79
III - 2.3. Relación entre contenido de antocianinas y parámetros de color	80
III - 3. Parámetros de color durante el almacenamiento a bajas temperaturas	83
III - 4. Contenido de antocianinas durante el almacenamiento a bajas temperaturas	87
III - DISCUSIÓN	89
III - CONCLUSIONES	91

**CAPITULO IV**  
**CARACTERIZACION Y EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD PPO DURANTE**  
**EL ALMACENAMIENTO**

IV - INTRODUCCION	92
IV - 1. POLIFENOL OXIDASA EN FRUTOS Y HORTALIZAS	92
IV - 1.1. Tipos de PPO	92
IV - 1.2. Distribución y localización subcelular de PPO	93
IV - 1.3. Cambios en la expresión de PPO durante el crecimiento, maduración y almacenamiento	94
IV - OBJETIVO	95
IV - MATERIALES Y METODOS	96
IV - 1. Material vegetal y almacenamiento	96
IV - 2. Desarrollo del daño por frío	96
IV - 3. Pardeamiento de la pulpa	96
IV - 4. Extracción enzimática	97
IV - 5. Medida de la actividad enzimática de PPO	97
IV - 6. Determinación del contenido de proteínas	98
IV - 7. Caracterización de la enzima PPO	98
IV - 8. Análisis estadístico	99
IV - RESULTADOS	100
IV - 1. Caracterización enzimática	100
IV - 1.1. Especificidad de sustrato	100
IV - 1.2. Efecto de la concentración de sustrato	100
IV - 1.3. Efecto de la concentración de extracto enzimático	100

IV - 1.4. Efecto del pH	101
IV - 1.5. Efecto de la temperatura	102
IV - 1.6. Estabilidad térmica de PPO	102
IV - 1.7. Efecto del agregado de SDS	104
IV - 2. Actividad PPO en las distintas fracciones enzimáticas	104
IV - 3. Cambios de la actividad PPO durante el almacenamiento de los frutos	105
IV - 4. Evolución del daño por frío	106
IV - 5. Evolución del pardeamiento del tejido interno del fruto	106
IV - DISCUSIÓN	107
IV - CONCLUSIONES	

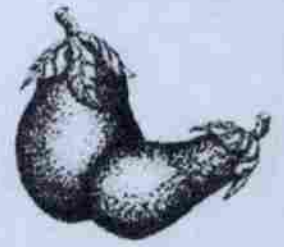
## CAPITULO V APLICACIÓN DE TÉCNICAS POSCOSECHA PARA RETARDAR EL DAÑO POR FRÍO

V - INTRODUCCION	110
V - 1. REDUCCION DEL DAÑO POR FRIO EN POSCOSECHA	110
V - 1.1. Técnicas poscosecha para reducir el daño por frío	110
a) Tratamiento térmico	111
b) Calentamiento intermitente	111
c) Atmósfera controlada	112
d) Tratamiento químico	112
e) Reguladores de crecimiento	112
f) Encerado y otras coberturas	113
g) Empacado con películas o atmósfera modificada	113
V - 2. Tratamientos térmicos	113
V - 2.1. Métodos	113
V - 2.2. Respuesta de los frutos y vegetales	114
V - 2.3. ¿Qué provoca la termotolerancia?	115
V - 2.4. Tolerancia al daño por frío	117
V - 3. Envasado en atmósfera modificada	118
V - 3.1. ¿Qué es?. Usos y beneficios	118
V - 3.2. Tipos de atmósferas modificadas	120
V - 3.3. El envasado mediante películas plásticas	121
V - 3.3.1. Tipos de películas	121
V - 3.4. Selección de las películas	122
V - 4. Tratamiento con metil jasmonato	123
V - 4.1. Biosíntesis y metabolismo	124
V - 4.2. Acción del jasmonato a nivel fisiológico	124
V - OBJETIVO	126
V - MATERIALES Y METODOS	127
V - 1. Material vegetal	127
V - 2. Tratamientos poscosecha	127
V - 2.1. Tratamiento con atmósfera modificada pasiva (AMP)	127
V - 2.1.1. Ensayos de almacenamiento en AMP	127
V - 2.1.1.1. Acondicionamiento y almacenamiento de los frutos	127
V - 2.1.1.2. Películas utilizadas	127
V - 2.1.2. Ensayos con fungicida y almacenamiento en AMP	128
V - 2.1.2.1. Acondicionamiento y almacenamiento de los frutos	128
V - 2.2. Tratamiento con metil jasmonato y almacenamiento en AMP	129
V - 2.3. Tratamiento térmico con aire seco y almacenamiento en AMP	130
V - 2.3.1. Acondicionamiento y almacenamiento de los frutos	130
V - 2.3.2. Tratamiento térmico en aire seco	130
V - 3. Determinaciones efectuadas	131
V - 3.1. Observaciones sensoriales de los frutos	131
V - 3.2. Pardeamiento de la pulpa	131

---

V - 3.3. Pérdida de electrolitos por parte del tejido	131
V - 3.4. Pérdida de peso	131
V - 3.5. Contenido de etileno interno	131
V - 3.6. Composición de la atmósfera dentro de los empaques	132
V - 3.7. Medida de textura	132
V - 3.8. Medida de la permeabilidad de las películas	133
V - 3.9. Extracción enzimática	134
V - 3.10. Medida de la actividad enzimática de PPO	134
V - 3.11. Medida de la actividad enzimática de POD	134
V - 3.12. Determinación del contenido de proteínas	134
V - 3.13. Análisis estadístico	135
V - RESULTADOS	136
V - 1. Almacenamiento en AMP	136
V - 1.1. Ensayos de almacenamiento en AMP	136
V - 1.1.1. Determinación de la permeabilidad al CO <sub>2</sub> a 0 y 10°C	136
V - 1.1.2. Cambios en la composición de la atmósfera dentro del empaquetamiento	137
V - 1.1.3. Evolución de la pérdida de peso	139
V - 1.1.4. Evolución del daño por frío	140
V - 1.1.5. Evolución del pardeamiento de la pulpa	142
V - 1.1.6. Evolución de la pérdida de electrolitos	144
V - 1.2. Ensayos con fungicida y almacenamiento en AMP	145
V - 1.2.1. Experiencia I: Frutos tratados con procloraz y almacenados a 0° y 10°C por 14 días en AMP	145
V - 1.2.2. Experiencia II: Frutos tratados y almacenados a 10°C durante 23 días en AMP	145
V - 1.3. Discusión	148
V - 2. Tratamiento con metil jasmonato y almacenamiento en AMP	149
V - 2.1. Selección del tipo de tratamiento y concentración de MJ	150
V - 2.2. Efecto del tratamiento con MJ y posterior almacenamiento en AMP a bajas temperaturas	151
V - 2.3. Discusión	153
V - 3. Tratamiento térmico y atmósfera modificada pasiva como tratamientos poscosecha	154
V - 3.1. Selección del TT	155
V - 3.2. Evolución del daño por frío con el TT elegido	156
V - 3.3. Cambios en el pardeamiento de la pulpa	159
V - 3.4. Cambios en la pérdida de electrolitos	160
V - 3.5. Evolución de la firmeza	161
V - 3.6. Cambios en la composición de la atmósfera dentro del empaquetamiento	162
V - 3.7. Evolución del contenido de etileno interno	163
V - 3.8. Contenido de proteínas	164
V - 3.9. Efecto del tratamiento sobre la actividad enzimática de PPO	164
V - 3.10. Efecto del tratamiento sobre la actividad enzimática de POD	165
V - 3.11. Discusión	166
V - DISCUSIÓN	169
V - CONCLUSIONES	172
DISCUSION GENERAL	174
CONCLUSIONES GENERALES	180
BIBLIOGRAFIA	182

---



# ***Introducción general***

## GENERALIDADES DE BERENJENA

La berenjena (*Solanum melongena* L.) pertenece a la familia de las solanáceas, la cual también incluye al pimiento, tomate y papa.

Se denomina *beringela* en Brasil, *eggplant* en EE.UU., *aubergine* en Francia y *melanzana* en Italia.

La *planta* es herbácea, aunque sus tallos presentan tejidos lignificados que le dan un aspecto arbustivo. Es 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. Las *hojas* son grandes, enteras, en general lobulares, de borde liso, provistas de pecíolo de color verde oscuro más o menos largo según la variedad y cubiertas de una vellosidad grisácea en el envés (Anónimo, 2001). Las *flores* son violetas, con forma de estrella y las mismas se encuentran solitarias o bien formando ramilletes de dos o más, situadas al extremo de un corto pedúnculo (Anónimo, 2002a). El *fruto* es una baya carnosa que presenta diversas formas: globosa, piriforme u ovoide más o menos alargada. Su color es negro, morado, blanco, blanco jaspeado de morado o verde. El interior del fruto suele poseer pocas semillas y una tonalidad blancuzca; mientras que si la misma es verde esto estará denotando un estado inmaduro del fruto (Anónimo, 2002a; Salunkhe y Desai, 1984)

### I. ANTECEDENTES

La berenjena, es un fruto desconocido en diversos países y muy común y apreciada en otros, entre los que se destacan China, India, Japón, los países del Mediterráneo y Estados Unidos, entre otros.

Nativa de los climas tropicales, los especialistas encuentran su origen muy probablemente en la India. Su crecimiento en este país era prácticamente espontáneo, de tal forma que la mitología hindú considera a la berenjena como un regalo de los dioses al

pueblo. A su llegada a Europa, muchos estudiosos de la botánica desaconsejaron su consumo debido a su "toxicidad" y la llamaron *Manzana Loca*. En realidad, los botánicos de aquella época se referían a aquellos componentes del fruto que, sin ser tóxicos, provocan en el paladar cierto gusto de acidez (Revista Abriendo Surcos, 1999). Con la llegada de los colonizadores al nuevo continente, esta especie hortícola comenzó a difundir de tal forma que en la actualidad destaca su cultivo en EE.UU, Argentina y México.

## 2. PROPIEDADES Y VALOR NUTRITIVO

Dentro de las propiedades de la berenjena se destaca su función como laxante, diurético, estimulante de la secreción biliar, antianémica, además de facilitar la digestión y reducir el colesterol en sangre (Revista Abriendo Surcos, 1999).

Su ingesta aporta sólo 29 kcal por cada 100 g. La composición química de estos frutos (tabla 1) denota su alto contenido acuoso y bajo aporte de proteínas y lípidos. Cabe destacar que el aporte de vitaminas y minerales es importante desde el punto de vista nutricional.

Tabla 1: Valor nutritivo de berenjena. Fuente: (Mangione y Sanchez, 1999)

Composición química cada 100 gr de porción comestible	
Agua	94,3 gr
Proteínas	1,0 gr
Glúcidos	4,1 gr
Lípidos	0,2 gr
Calcio	11,0 mg
Fósforo	21,0 mg
Hierro	0,6 mg
Vitamina A	10 U.I.
Vitamina C	3,0 mg

## 3. EXIGENCIAS PARA SU CRECIMIENTO

- a) **Temperatura:** El cultivo de la berenjena es de climas cálidos y secos, por lo que se considera uno de los más exigentes en calor (más que el tomate y el pimiento). Soporta

bien las temperaturas elevadas, siempre que la humedad sea adecuada, llegando a tolerar hasta 40-45 °C (Tabla 2). La temperatura media debe estar comprendida entre 23-25 °C.

Tabla 2- Temperaturas críticas para berenjena en las distintas fases de desarrollo.  
Fuente: Anónimo 2002a.

FASES DEL CULTIVO	TEMPERATURA (°C)		
	ÓPTIMA	MÍNIMA	MÁXIMA
Germinación	20-25	15	35
Crecimiento vegetativo	20-27	13-15	40-45
Floración y fructificación	20-30		

A temperaturas próximas a la mínima (10-12 °C) o a la máxima (40-45 °C), se reducen los procesos biológicos, induciendo el retraso del crecimiento y afectando a la floración, la fecundación y posterior desarrollo del fruto.

- b) **Humedad:** La humedad relativa óptima oscila entre el 50 % y el 65 %. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y dificultan la fecundación. Cuando la humedad y la temperatura son elevadas se produce una floración deficiente, caída de flores, frutos deformes y disminución del crecimiento. Efectos similares se producen cuando la humedad relativa es escasa (Anónimo, 2002a).
- c) **Luminosidad:** Es una planta muy exigente en luminosidad, requiere de 10 a 12 horas de luz, por lo que en días cortos (otoño-invierno) es necesario aprovechar al máximo las horas de luz para evitar el aborto de flores y un desarrollo vegetativo demasiado exuberante (Anónimo, 2002a).
- d) **Suelo:** Es poco exigente en suelo, debido a que posee un potente y profundo sistema radicular. No obstante, los suelos más adecuados son los francos y profundos. En suelos arcillosos pueden presentarse problemas de asfixia radicular, mostrando rápidamente los síntomas (Anónimo, 2002a).

Los valores de pH óptimos oscilan entre 6 y 7, aunque en suelos enarenados puede cultivarse con valores de pH comprendidos entre 7 y 8,5. En suelos ácidos presenta



problemas de crecimiento y producción. Es menos resistente a la salinidad del suelo y del agua de riego que el tomate y más que el pimiento, siendo más sensible durante las primeras fases del desarrollo (Anónimo, 2002a).

#### 4. VARIEDADES

Existen numerosas variedades de berenjenas que, desde el punto de vista agronómico, se clasifican de acuerdo a las siguientes características (Mangione y Sanchez, 1999):

- **Precocidad:** tempranas (entran en producción 4 meses después de haber sido plantadas) y tardías (se retrasan hasta 20 días).
- **Color de los frutos:** se encuentran violetas o negras, blancas y jaspeadas o veteadas.
- **Forma:** se distinguen aquellas que son largas, aperadas y globosas.

Algunas de las variedades más comercializadas a nivel mundial son (Cantwell y Suslow, 1999; Anónimo, 2002a):

- *Black Beauty*: variedad tardía, de porte bajo, con fruto oval redondeado y color violeta muy oscuro.
- *Reina Negra*: variedad con plantas de porte medio. Frutos grandes y uniformes, de forma oval y color negro brillante. Para invernadero y bajo túnel.
- *Cava FI*: planta muy vigorosa de porte alto. Fruto de color negro intenso, brillante y de gran firmeza. Cáliz pequeño.
- *China*: fruto elongado, delgado, color púrpura claro.
- *Blanca*: fruto pequeño, de forma oval o globular, de piel delgada.
- *Japonesa*: fruto elongado, delgado, color púrpura claro a oscuro. Muy perecedera. La variedad *Money Maker N°2*, empleada en el presente trabajo de Tesis, es temprana, violeta-negra y alargada, pero corta.

## 5. ESTACIONALIDAD

El ingreso de berenjenas al Mercado Central de Buenos Aires (Mangione y Sanchez, 1999) se produce a lo largo de todo el año desde distintas zonas del país, con una disminución en la cantidad de bultos durante los meses de invierno (Tabla 3). En el caso particular de la variedad empleada en el presente trabajo de Tesis, la disponibilidad de la misma se corresponde con lo que muestra la tabla para la provincia de Buenos Aires (disponibilidad regular en Noviembre y Diciembre, y abundante desde Enero a Mayo)

Tabla 3: Disponibilidad de oferta zonal de berenjena. Fuente: Mangione y Sanchez, 1999.

Prov.	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic
Bs.As.	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
Salta	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
SantaFé	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Corrientes	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Jujuy	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Formosa	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Mendoza	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Brasil	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Paraguay	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Escasa o Nula	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante

	Abundante
	Regular
	Escasa o Nula

## 6. PRODUCCIÓN Y CONSUMO

A partir de la segunda mitad de la década del '90, la producción mundial ha registrado un crecimiento constante. Esto ha sido el resultado de la combinación de una mayor superficie destinada al cultivo, así como de mayores niveles de productividad de los principales países productores (Revista Abriendo Surcos, 1999).

En lo que se refiere a la superficie cosechada a nivel mundial ésta creció en más del 23% entre el '94 y '98 (Food and Agriculture Organization - F.A.O, 1999.); mientras que los rendimientos aumentaron en 5,96% en el mismo lapso.

A nivel mundial se pueden distinguir cinco países como los más importantes productores de berenjena: China (50%), India ( 21%), Turquía (5%), Japón (3%) y Egipto (3%) (Revista Abriendo Surcos, 1999).

Al igual que la producción, el comercio mundial de berenjena ha mostrado una tendencia alcista en la última década, lo que sin duda denota el incremento de la demanda del producto en la dieta de los consumidores. Las exportaciones promedio en la última década se ubicaron en 154,1 mil toneladas, con una variación porcentual de prácticamente 40%. De los principales países exportadores resaltan por su importancia México, Países Bajos, España y Jordania, los cuales en conjunto exportan, en promedio anual, poco más del 70% del total mundial. Por lo que corresponde a las importaciones, el crecimiento que han tenido en la pasada década fue del 30,1%, con un volumen promedio anual de 124,8 mil toneladas. Alrededor del 70% de las importaciones las concentran EE.UU., Francia, Alemania, Canadá y el Reino Unido (Revista Abriendo Surcos, 1999).

En nuestro país el cultivo se realiza a campo o invernáculos, concentrándose en los cinturones hortícolas de diferentes zonas y donde se destina al mercado interno para su consumo en fresco. Las principales provincias productoras son: Salta (48%), Buenos Aires (27%), Santa Fé (12%) y Jujuy (4%) (Mangione y Sanchez, 1999). Los datos correspondientes a la zona de Buenos Aires se muestran en la Tabla 4. En ella se puede apreciar que en La Plata se produce el mayor porcentaje (25,49%).

Tabla 4: Superficie y producción por cultivo de berenjena en el Cinturón Verde de Buenos Aires. Datos de 1998.  
Fuente: Estadísticas y Censos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA).

Partido	Superficie Plantada (ha)			Producción (t)			
	A Campo	Bajo Cubierta	Total	A Campo	Bajo Cubierta	Total	(%)
LA PLATA	29,05	0,93	29,98	583,77	36,41	620,18	25,49
FLORENCIO VARELA	14,17	2,16	16,33	310,82	29,95	340,77	14,01
BERAZATEGUI	10,80	0,13	10,93	154,61	1,92	156,53	6,44
Total ZONA 1	54,02	3,22	57,24	1.049,20	68,28	1.117,48	45,94
CAÑUELAS	5,03	0,09	5,12	95,10	10,08	105,18	4,32
E. ECHEVERRIA	3,45	0,01	3,46	31,00	0,30	31,30	1,29
EZEIZA	7,00	0,20	7,20	79,70	10,00	89,70	3,69
GRAL. RODRIGUEZ	10,95	-	10,95	213,80	-	213,80	8,79
LUJAN	1,85	-	1,85	51,42	-	51,42	2,11
MARCOS PAZ	17,71	-	17,71	307,50	-	307,50	12,64
MERLO	4,29	-	4,29	91,74	-	91,74	3,77
MORENO	11,82	-	11,82	107,72	-	107,72	4,29
ZARATE	7,95	1,00	8,95	236,48	80,00	316,48	13,01
Total ZONA 2	70,05	1,30	71,35	1.214,46	100,38	1.314,84	54,06
TOTAL	124,07	4,52	128,59	2.263,66	168,66	2.432,32	100

Los volúmenes comercializados en el Mercado Central de Buenos Aires han presentado una tendencia decreciente desde el año 1991 al año 1996, con una importante recuperación a partir del año 1997.

## 7. COSECHA

La berenjena se cosecha 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. Generalmente, se recolectan antes de que las semillas empiecen a engrosar, ya que los frutos con semillas amargan el paladar, no siendo necesario que el fruto haya alcanzado la madurez fisiológica. En el momento adecuado para su recolección el fruto debe presentar un aspecto brillante y firme. La pulpa de la berenjena se vuelve esponjosa y amarga cuando el fruto llega a sobremadurez (Anónimo, 2001).

## 8. ALMACENAMIENTO POSCOSECHA

Aunque existe una gran variedad de cultivares se puede llegar a unificar criterios en cuanto a su respuesta al ambiente en condiciones de poscosecha.

Dentro de los factores ambientales que influyen en el deterioro de los productos frutihortícolas se encuentran: la temperatura, la humedad relativa, la composición atmosférica, el etileno y las enfermedades que puedan desarrollarse:

### a) Temperatura óptima y humedad relativa

La *temperatura recomendada* es 10-12°C con humedad relativa (HR) 90-95%.

El período de almacenamiento de las berenjenas es generalmente inferior a 14 días a la temperatura recomendada debido a que la calidad visual y sensorial se deteriora rápidamente. También es probable que aumente el desarrollo de podredumbres cuando se les almacena por más de 2 semanas, especialmente después de transferirlas a las

condiciones de venta al público. Las temperaturas de tránsito, o para el almacenamiento de corto plazo, inferiores a lo recomendado se aplican a menudo para reducir la pérdida de peso, pero pueden provocar daño por frío después de algunos días (Cantwell y Suslow, 1999).

El otro factor a tener en cuenta durante la conservación poscosecha es la HR. La misma no debe ser inferior al 85%, ya que la vida del producto disminuye notablemente.

A temperatura de 12,5°C la *tasa de respiración* es de 62-69 ml CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para la variedad Japonesa (Cantwell y Suslow, 1999).

b) **Atmósferas controladas y modificadas**

El almacenamiento en atmósfera controlada o atmósfera modificada ofrece poco beneficio para la conservación de la calidad de las berenjenas. Las concentraciones bajas de O<sub>2</sub> (3-5%) retrasan por unos días su deterioro y el comienzo de pudriciones. Las berenjenas toleran hasta 10% CO<sub>2</sub> pero el incremento en la vida de almacenamiento no es superior al que se obtiene con concentraciones reducidas de O<sub>2</sub>. El almacenamiento con películas reduce la pérdida de peso y mantiene la firmeza, debido a la alta humedad relativa (Cantwell y Suslow, 1999).

c) **Sensibilidad al etileno**

La berenjena es muy sensible a la presencia del etileno, y aunque tiene una baja producción de este gas, como el pimiento, el melón, el zapallo, la sandía y los 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 berenjena será compatible con: zapallito, papa, pepino, pimiento, pomelo. La exposición de estos frutos al etileno disminuye su tiempo de conservación de 14 días a 3-5 días (Mangione y Sanchez, 1999). Cuando se les expone a más de 1 ppm de etileno durante la distribución y el almacenamiento de corto plazo, la abscisión del cáliz y el deterioro, particularmente el pardeamiento, pueden convertirse en un problema (Cantwell y Suslow, 1999).

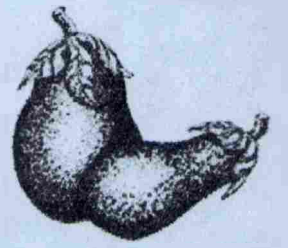
A temperatura de 12,5°C la *tasa de producción de etileno* es de 0,1-0,7  $\mu\text{l.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para la variedad Japonesa (Cantwell y Suslow, 1999).

d) Enfermedades

Las enfermedades son una causa importante de pérdidas postcosecha, particularmente en combinación con el daño por frío (Cantwell y Suslow, 1999). Los hongos fitopatógenos más comunes son *Alternaria* (pudrición por moho negro), *Botrytis* (pudrición por moho gris), *Rhizopus* (pudrición algodonosa) y *Phomopsis* Rot.

## 9. DAÑO POR FRÍO

Las berenjenas son sensibles a esta fisiopatía a temperaturas inferiores a 10°C. A 5°C el daño por frío se presenta en 6-8 días. Los síntomas son: punteado (depresiones en la superficie), desarrollo de escaldaduras y pardeamiento de las semillas y pulpa. En frutas sujetas al daño por frío es común el desarrollo acelerado de la pudrición por *Alternaria spp* (Cantwell y Suslow, 1999). El daño por frío es acumulativo y puede iniciarse en el campo antes de la cosecha. La sensibilidad de las berenjenas al daño por frío difiere con el estado de madurez, tamaño del fruto, cultivar y período de cosecha. Aquellos frutos cosechados con madurez óptima o a mediados del verano son más sensibles que aquellos cosechados con sobremadurez o en otoño, cuando las temperaturas de crecimiento son más bajas (Anónimo, 2000).



## ***Objetivos***

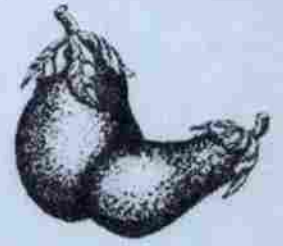
---

El *objetivo general* del trabajo de Tesis fue estudiar el desarrollo del daño por frío en un fruto no-climatérico como la berenjena, y analizar tratamientos tendientes a minimizarlo.

Los *objetivos parciales* fueron:

- Establecer las alteraciones estructurales del tejido como consecuencia del daño por frío.
- Estudiar las respuestas del estrés térmico a través de la biosíntesis de etileno, la evolución del color y la actividad de la enzima polifenol oxidasa.
- Estudiar la influencia de tratamientos con fitohormonas, físicos y combinación de ellos sobre el desarrollo del daño por frío y sus manifestaciones con el fin de regularla.





## ***Capítulo I***

# ***Evolución del daño por frío en berenjenas***

## I – INTRODUCCION

### I – I. DAÑO POR FRÍO EN FRUTOS Y HORTALIZAS

El almacenamiento a bajas temperaturas es una técnica importante en la preservación de productos frescos. El deterioro asociado a la maduración y senescencia de frutos y hortalizas es retardado por el almacenamiento a bajas temperaturas. Cada especie de origen tropical o subtropical soporta una temperatura mínima, por debajo de la cual sufre daño por frío, siendo la misma superior al punto de congelación del producto.

Este tipo de daño es una condición de estrés, por lo que frutos y hortalizas, en general, responden aumentando la producción de etileno, entre otras manifestaciones. El grado de estímulo es mayor en aquellos que se encuentran en el período preclimático (Lelièvre y col., 1995).

### I – II. TIPOS DE DAÑO

Los síntomas del daño por frío adoptan formas muy variadas. En frutos y vegetales de origen tropical o subtropical, el daño se manifiesta como punteado superficial, pérdida del color, pardeamiento interno, lentitud en los procesos de maduración, pérdida del aroma y sabor y decaimiento general. El desarrollo de estos síntomas es dependiente no sólo de la especie y cultivar, sino también del grado de madurez, tipo de tejido y de factores ambientales tal como la humedad ambiente (Wang, 1994).

En general, la manifestación más común y la primera en ocurrir en frutos y vegetales es el punteado superficial, el cual puede ser de tipo circular o bien de forma irregular (Pantastico, 1979). Este síntoma permite agrupar a los siguientes frutos: arvejas, cítricos, berenjenas, melones, papayas, pomelos, batatas, etc. Otro síntoma de daño por frío es el retardo en los procesos de maduración, lo cual permite englobar a los siguientes frutos y vegetales: palta, banana, mango, melones, papayas, tomates, etc. (Wang, 1994).

El daño ocasionado es mayor, en general, cuanto menor es la temperatura (Fidler, 1968), pero para que estos síntomas de daño puedan ser visualizados, generalmente, el tejido debe ser llevado a condiciones en las que la temperatura sea mayor (temperatura ambiente).

## 1 - 1.2. CONDICIONES QUE INDUCEN DAÑO POR FRÍO

### 1 - 1.2.1. Temperatura

Si un dado cultivar de una determinada especie de fruto o vegetal es susceptible al daño, existe una temperatura crítica por debajo de la cual se produce el daño. El almacenamiento a temperaturas por encima de este valor crítico se traduce en una mayor vida útil del producto.

El valor de esta temperatura crítica puede ser algo alta. De hecho el valor para bananas Lacatan es de 14 °C (Fidler, 1968). Para otras variedades es de 11 °C. Para frutos tropicales o sub-tropicales las temperaturas van de 8 a 12 °C (Pantastico, 1979).

Pantastico (1979) recomienda, para berenjenas, temperaturas de 10° a 12,8 °C y RH de 92% para almacenarlas entre 2 o 3 semanas, dependiendo de la variedad o región donde se cultive.

### 1 - 1.2.2. Tiempo de exposición

El grado de severidad del daño por bajas temperaturas es dependiente del tiempo de exposición, más que de la temperatura misma.

Cabe notar que tanto el tiempo como la temperatura de exposición dependen, a su vez, del estadio fisiológico en el que se halle el producto. En pimientos verde-maduros expuestos a 1°C por 3 días fue encontrado un desarrollo de punteado superficial y un estímulo en la producción de CO<sub>2</sub> y etileno, mientras que aquellos que se hallaban

- aparición de restos de lípidos en cloroplastos, citoplasma, vacuolas y entre la pared celular y el plasmalema (Platt-Aloia y Thomson, 1976; Niki y col, 1978; Wise y col, 1983),
- inflamación de las organelas debida a la destrucción de la regulación osmótica, y la aparición de cuerpos lipídicos dentro de la célula (Marangoni y col, 1989),
- incremento del espacio intercelular (Brovelli y col, 1998),
- pérdida de turgencia.

En general, la alteración en la fluidez de los lípidos de membrana sería la causante de los síntomas posteriores del daño por frío. Es esta la teoría que más se acepta en la actualidad.

#### *I - 1.3.1.1. Teoría de la transición de fase*

Desde hace tiempo se postula que la naturaleza física de los lípidos de las membranas celulares son los responsables de la habilidad de adaptación de las plantas superiores ante las condiciones climáticas donde se desarrollan. Autores tales como Lyons (1973) propusieron las bases de esta teoría, la cual contempla una transición de fase de los lípidos de membrana a una temperatura crítica. Esto es, los lípidos se hallan bajo una estructura de líquido cristalino y ante temperaturas menores que la temperatura crítica evolucionan hacia una fase tipo gel-sólido. El resultado final es el comienzo de una pérdida de la permeabilidad de las membranas celulares causando una pérdida de la compartimentalización y control regulatorio; y finalmente se arriba a una pérdida irreversible del balance metabólico con el que las plantas llegan a una destrucción fisiológica y posterior muerte.

Existen plantas resistentes (CR) o sensibles (CS) al daño por frío, y en parte, esto tiene que ver con el contenido de ácidos grasos insaturados que forman parte de los lípidos de membrana. En las CR un 70% de los ácidos grasos de la membrana son insaturados, mientras que para las CS el porcentaje es mucho menor. Se sabe que ante la exposición a bajas temperaturas las CS aumentan el contenido de ácidos grasos insaturados a efectos de disminuir la temperatura de transición de fase y retardar así el

daño por frío (Parkin y col. 1989). Aparentemente, esta tendencia a insaturar los ácidos grasos resulta de un aumento de la actividad desaturante a bajas temperaturas, ó una disminución de la velocidad de síntesis *de-novo* de lípidos saturados comparada con la velocidad de desaturación, lo que resulta en un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados (Murata y Nishiyama, 1998). Ensayos efectuados a nivel de biología molecular con cianobacterias, demostraron que dicha desaturación está regulada por la expresión de los genes de desaturación (los estudios en este tema aún siguen en desarrollo).

La transición de fase (líquido-sólido) mencionada recientemente ha sido descrita de la siguiente manera (Parkin y col. 1989): la bicapa lipídica que constituye las distintas membranas celulares se hallaría en una continua transición a una determinada temperatura crítica, donde la estructura inicial de dicha bicapa se iría transformando en micelas invertidas (figura I-1) que posteriormente podrían resultar en micelas invertidas de tipo tubular o de empaquetamiento cerrado para luego culminar en un arreglo hexagonal de tipo II ó bien en un arreglo cúbico.

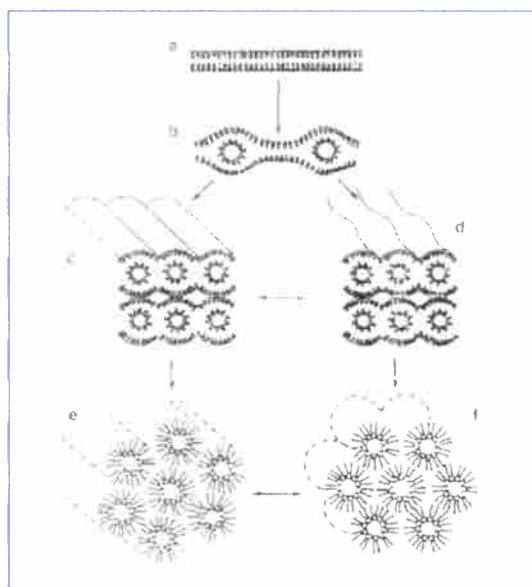


Figura I-1: Arreglos moleculares de lípidos de membrana. a) lamela, b) micelas invertidas, c) micelas invertidas y tubulares, d) arreglo compacto-cerrado de micelas invertidas dentro de la bicapa, e) hexagonal II, f) arreglo cúbico. (Extraído de Parkin y col., 1988)

### I – 1.3.3. Cambios en la concentración de los metabolitos

Análisis comparativos entre tejidos normales y tejidos dañados por su exposición a bajas temperaturas demuestran grandes cambios en el contenido de diversos metabolitos.

En bananas dañadas se verifica una disminución de la velocidad de hidrólisis del almidón respecto de aquellas que no poseen daño (Fidler, 1968). La fluctuación en los ácidos orgánicos depende de cada fruto u hortaliza (Uritani, 1978), por ejemplo en manzanas se verifica un aumento en la pérdida de los mismos (Fidler y col., 1967). Existe, también, acumulación de productos secundarios tales como polifenoles (Lieberman y col., 1958).

## I- 2. RESPIRACIÓN EN FRUTOS Y HORTALIZAS

### I – 2.1. FUNDAMENTOS FISIOLÓGICOS DE LA RESPIRACIÓN

La vida de un fruto la podemos dividir en 3 etapas fisiológicas fundamentales: el crecimiento, la maduración y la senescencia.

- El *crecimiento* comprende el aumento del número de células y el posterior alargamiento celular, ambas responsables del tamaño final alcanzado por el fruto.
- La *maduración* suele iniciarse antes de que termine la fase de crecimiento e incluye diferentes actividades metabólicas.
- A la *senescencia* podemos definirla como una fase en la que los procesos anabólicos (sintéticos) dan paso a los catabólicos (degradativos) conduciendo al envejecimiento y, finalmente, a la muerte del tejido.

La *maduración organoléptica* es el proceso por el que los frutos adquieren las características organolépticas (color, aroma, sabor, textura, etc.) que los definen como comestibles, proceso que, generalmente comienza durante las etapas finales de la

*maduración fisiológica* (que en general coincide con el momento en que las semillas comienzan a ser viables y los frutos pueden proseguir con la maduración organoléptica aún separados de la planta madre y constituye el comienzo de la senescencia). Durante dicho proceso tienen lugar una serie de cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos determinantes de la calidad y vida postcosecha del fruto. Entre los más importantes podemos citar: cambio del color, cambios en la composición de proteínas, carbohidratos y en la producción de aromas; cambios en los ácidos orgánicos y en los polifenoles. Una consideración especial merecen los cambios relacionados a la actividad respiratoria y producción de etileno que consideraremos a continuación, y que permiten distinguir entre frutos climatéricos y no climatéricos.

#### 1 - 2.1.2. Patrón climatérico

Ya en la década del '20, Kidd y West, verificaron un aumento en la velocidad de respiración de manzanas. Ellos llamaron a este fenómeno "respiración climatérica" y así describían la fase crítica en la vida de los frutos. A lo largo de los años este fenómeno se ha ido estudiando y se vió que: en frutos climatéricos se percibe una disminución a valores mínimos denominado "*pre-climatérico*" seguido por un incremento, más o menos importante dependiendo de la especie, hacia un máximo conocido como "*pico climatérico*" y una subsecuente disminución de la velocidad de respiración considerado como "*post-climatérico*". Los valores de O<sub>2</sub> liberados y la velocidad de respiración por cada fruto o vegetal varían ampliamente: en manzanas la actividad respiratoria en el pico es aproximadamente el doble de la velocidad inicial (Figura 1-2), en banana el incremento es de diez veces, mientras que en durazno sólo es del 30%.

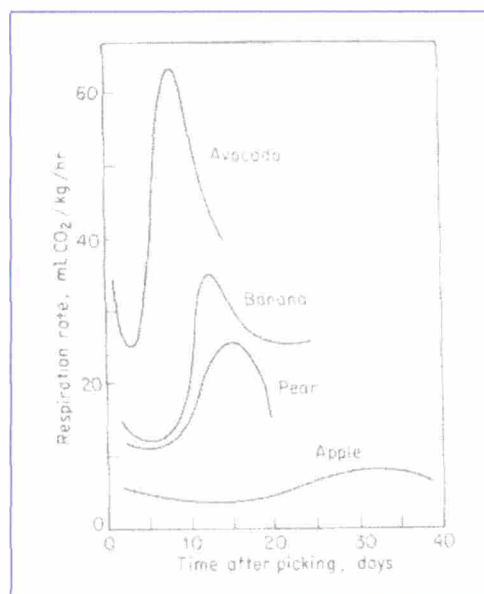


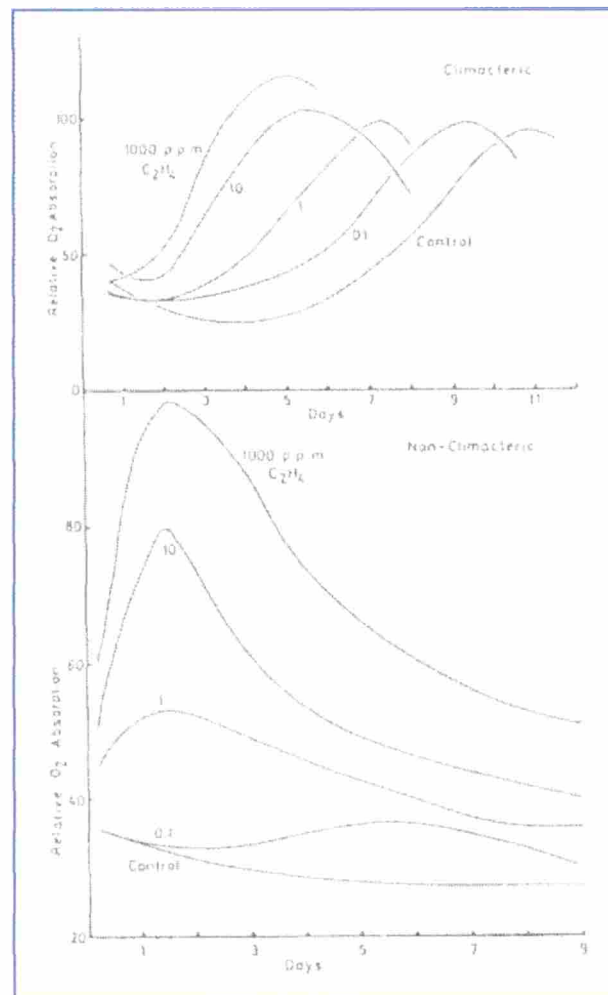
Figura I-2: Pico climatérico de varios frutos. Puede verse que el aumento en la velocidad de respiración varía de uno a otro. (Extraído de Leshem (1986) en "Processes and Control of Plant Senescence", pág. 36).

En frutos y hortalizas de tipo climatérico (tabla I-1) la velocidad de producción de etileno aumenta drásticamente con la respiración climatérica, hasta alcanzar un pico (tabla I-2) para luego mantener un valor relativamente alto durante la maduración. Este pico de etileno, según el fruto, puede anteceder (banana), coincidir (mango, pera, palta) o ser posterior (manzana, tomate) al pico de respiración. Este incremento es esencialmente logarítmico, además se sabe que dicho proceso es autocatalizado por el gas. McMurchie y col. (1972), en base a sus estudios, propusieron que son dos los sistemas involucrados en la regulación natural de la maduración. El *Sistema 1* sería el encargado de llevar a cabo la biogénesis del etileno, ésta sería iniciada por un factor involucrado en el proceso de envejecimiento del tejido, así se mantendría un nivel basal de etileno en los tejidos de los frutos y hortalizas pero que sería suficiente como para inducir la respiración climatérica y los cambios asociados a la maduración. El *Sistema 2* produciría el disparo en la producción de etileno hallada en los de tipo climatérico.

Tratamientos con etileno exógeno (Figura I-3) acortan los períodos anteriores al aumento climatérico, pero sin afectar el valor máximo de la respiración en el pico climatérico. Se encontró una relación logarítmica entre los valores de etileno aplicados y el



adelanto en el pico climatérico (Burg, 1962). Viendo que estos tratamientos con etileno inducen un gran incremento en el etileno interno seguido de la inducción del pico climatérico, y el nivel acumulado en el tejido excede ampliamente al nivel requerido para saturar la respuesta a la maduración, se concluye que no tendría sentido aplicar etileno cuando el aumento climatérico ha dado comienzo.



**Figura 1-3:** Efecto sobre el nivel de respiración de distintas concentraciones de etileno aplicado en frutos climatéricos no maduros (arriba) o frutos no-climatéricos (abajo). (Extraído de Thimann (1980) en "Senescence in Plants", pág. 166).

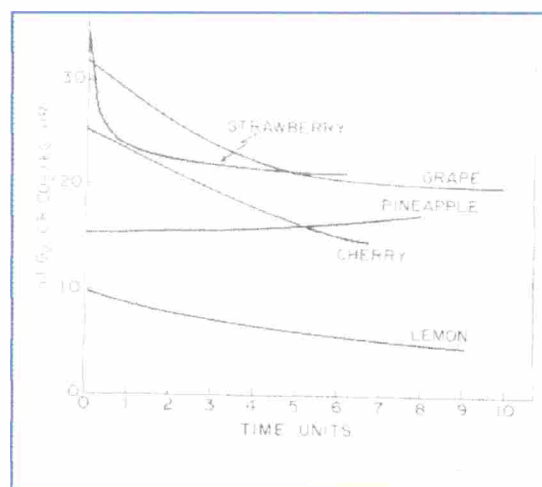
En base a todo lo expuesto se podría definir como climatérico al *período en la ontogenia de ciertos frutos y hortalizas durante el cual una serie de cambios bioquímicos son iniciados por la producción autocatalítica de etileno, marcando el cambio entre el*

crecimiento y la senescencia e implicando un incremento en la respiración y el comienzo de la maduración (Thimann, 1980).

### 1 - 2.1.3. Patrón no-climatérico

Existen frutos y hortalizas (tabla I-1, Figura I-4) que no presentan un incremento en la respiración, como así tampoco una producción acelerada de etileno durante la maduración, sino que más bien los niveles de este último son muy bajos (tabla I-2). El ejemplo más estudiado son los cítricos.

En frutos no-climatéricos tratados con etileno, se percibe un aumento en la respiración, pero sin alterar la producción autocatalítica del etileno. La respuesta en la respiración obedece a una relación logarítmica respecto del etileno aplicado (Burg, 1962). Esto es una diferencia importante respecto de los frutos y vegetales de tipo climatérico (Figura I-3). También se debe notar que ni bien se retira la aplicación de etileno, los niveles de respiración y los demás cambios asociados vuelven a los valores iniciales y el tejido se vuelve susceptible a nuevas aplicaciones de etileno.



**Figura I-4:** Patrones de respiración no-climatéricos. Unidades de tiempo: (cherry) 1 unidad=1 día, (grape) uva 1=4 días, (lemon) limón 1=7 días, (pineapple) ananá 1=1 día, (strawberry) frutilla 1=0,5 días. (Extraído de Friend (1981) en *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, pág. 6)

Todos aquellos frutos y hortalizas clasificados como no-climatéricos poseen el Sistema I mencionado anteriormente y el Sistema II está reprimido o directamente está ausente.

Cabe destacarse que la berenjena, fruto bajo estudio en este trabajo de Tesis, es del tipo de los no-climatéricos.

**Tabla I-1:** Frutos y hortalizas con patrones de respiración climatérico y no climatérico. (Extraído de Leshem (1986) en "*Processes and Control of Plant Senescence*", pág. 178).

<i>Climatéricos</i>		<i>No climatéricos</i>	
banana	melón	aceituna	limón
ciruela	palta	ananá	naranja
cherimoya	papaya	arándano	pepino
durazno	pera	berenjena	pomelo
higo	tomate	cacao	uva
mango	sandía	frutilla	
manzana			

**Tabla I-2:** Niveles internos de etileno en  $\mu\text{l/l}$  (ppm) en frutos y hortalizas climatéricos y no-climatéricos (Extraído de Leshem (1986) en "*Processes and Control of Plant Senescence*", pág. 180).

#### *Frutos y hortalizas Climatéricos*

Fruto	Estadio	
	Preclimatérico	Climatérico
Banana	0.2	25
Durazno	0.02	42
Higo	0.1	4.5 - 5.2
Mango	0.04 - 0.05	2 - 3
Manzana	0.02 - 0.03	100
Melón	0.05	30 - 70
Pera	0.08 - 0.46	40
Tomate	0.03 - 0.3	27

#### *Frutos y hortalizas No-Climatéricos*

Rango de Valores	
Limón	0.11 - 0.17
Naranja	0.04 - 0.12
Mandarina	0.014 - 0.028
Uva Doradillo	0.014 - 0.02
Uva Shiraz	0.1 - 0.01

## I - OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo fue estudiar la evolución de los síntomas de daño por frío en berenjenas Money Maker N°2 almacenadas a 0, 5 y 10°C.

## I - MATERIALES Y METODOS

### I - 1. Material vegetal y almacenamiento

Las experiencias se llevaron a cabo empleando berenjenas cv Money Maker N°2 (*Solanum melongena* L.) cultivadas bajo invernadero en una quinta de la zona de La Plata, Provincia de Buenos Aires. Las mismas se cosecharon del mismo invernáculo, con madurez comercial y con un tamaño promedio de  $13 \pm 2$  cm de longitud y un peso promedio de  $75 \pm 10$  g.

Una vez en el laboratorio, a los frutos libres de daños se los lavó cuidadosamente con agua y se los dejó secar.

Las berenjenas se distribuyeron al azar en grupos de 6 frutos. Cada grupo se empacó en bolsas de 30 x 20 cm de polietileno de baja densidad (LDPE), a las cuales se les efectuaron 30 agujeros de 5 mm de diámetro (12% del área total), para permitir un buen intercambio gaseoso. Luego, se almacenaron las bolsas en cámaras de 0, 5 y 10°C por 15 días. Las determinaciones fueron efectuadas al inicio y luego de 2, 6, 9, 13 y 15 días de almacenamiento. Una vez que los frutos fueron retirados del almacenamiento a baja temperatura se los colocó a 20°C por 24 h adicionales. Se dispusieron al menos 2 bolsas para cada tiempo y temperatura analizados.

A cada día de muestreo correspondiente, los frutos fueron sometidos a la evaluación del avance de daño por frío mediante el valor de índice de daño; se efectuaron las medidas de pérdida de peso, pérdida de electrolitos y luminosidad del tejido ( $L_0$ ); y se tomaron muestras para el análisis por microscopía electrónica.

### I - 2. Observaciones sensoriales y cálculo del índice de daño

A cada día de muestreo los frutos fueron evaluados visualmente, observándose los síntomas de daño por frío en la pulpa y piel de los mismos. Se elaboró una escala subjetiva

que consideró los distintos síntomas de daño por frío observados para este fruto (tabla I-3). Los niveles de daño se expresaron de acuerdo a la escala propuesta por Lederman y col. (1997) con algunas modificaciones: 5 = daño severo, 4 = daño moderado, 3 = daño regular, 2 = daño leve, 1 = sin daño.

Table I-3: Síntomas de daño por frío considerados en cada valor de índice de daño por frío (ID) en berenjenas (*Solanum melongena* L., cv Money Maker N°2) almacenadas a bajas temperaturas.

Índice de daño por frío	1	2	3	4	5
Síntomas	- Color púrpura en la piel debajo del cáliz - Color púrpura oscuro en la piel de zona ecuatorial - Brillo superficial - Pulpa sin daño	- Decoloración de la piel debajo del cáliz - Pérdida del brillo	- Punteado - Pardeamiento de semillas - Pardeamiento incipiente de la pulpa - Pequeñas escaldaduras en la piel	- Escaldaduras en la piel debajo del cáliz - Escaldaduras en la piel de zona ecuatorial - Pardeamiento de semillas y pulpa	- Tejido jugoso o corchoso
Categoría	<i>Sin daño</i>	<i>Daño leve</i>	<i>Daño moderado</i>	<i>Daño regular</i>	<i>Daño severo</i>

El índice de daño por frío (ID) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de daño (ID)} = \frac{(\text{nivel de daño}) * (\text{n}^\circ \text{ de frutos en el nivel})}{(\text{total de frutos en el tratamiento})} \quad (\text{I -1})$$

### I - 3. Evaluación de la pérdida de peso

Al inicio y luego de cada período de almacenamiento, se procedió a pesar cada fruto. Se calculó la pérdida de peso porcentual con respecto al peso inicial.

### I - 4. Pardeamiento de la pulpa

Se midió el parámetro  $L^*$  empleando un colorímetro Minolta modelo CR-300 sobre rodajas de fruto (0,5 cm de espesor) recién cortadas pertenecientes a la zona ecuatorial del mismo. Para cada medida se utilizaron 3 frutos. Los valores se expresaron como  $L_0$ .

#### **I - 5. Evaluación del potencial de oxidación**

El potencial de oxidación ( $\Delta L$ ) se estimó usando un método objetivo (Larrigaudiere y col., 1998). Se empleó un colorímetro Minolta modelo CR-300 para medir el parámetro de color  $L^*$  en la superficie de una rodaja (0,5 cm de espesor) extraída de la sección ecuatorial del fruto. Dicho parámetro se midió al momento de cortar la rodaja y luego de 30 min. El valor del potencial de oxidación se expresó según la siguiente relación  $\Delta L = (L_0 - L_{30 \text{ min}})$ . Todas las medidas se efectuaron por triplicado.

#### **I - 6. Determinación de la pérdida de electrolitos por parte del tejido**

Se extrajo con sacabocado un cilindro, tanto de la zona ecuatorial como de aquella zona debajo del cáliz del fruto. Se cortaron discos de tejido de 10 × 3 mm pertenecientes al endocarpio y mesocarpio. Se colocaron discos (2 g) provenientes de 4 frutos en 20 ml de manitol 0,6 M. Empleando un conductímetro se midió, a 20°C, la conductividad de la solución circundante al comienzo ( $C_{ei}$ ) y luego de 2 h ( $C_{ef}$ ). Luego, se filtró el tejido y éste fue triturado en presencia de 20 ml de agua bidestilada empleando un homogenizador (Dupont Instruments Sorvall® Omni-Mixer). El homogenato resultante se centrifugó a 17500 × g por 15 minutos a 20°C y se midió la conductividad de los electrolitos remanentes en el sobrenadante ( $C_{er}$ ). Las determinaciones se efectuaron por duplicado y en forma separada para cada zona (ecuatorial y debajo del cáliz) y los resultados se expresaron como:

$$\text{Conductividad Relativa \%} = \frac{(C_{ef} - C_{ei}) * 100}{(C_{ef} + C_{er})} \quad (I - 2)$$

#### **I - 7. Medida de la acidez iónica**

A cada temperatura y día de muestreo se seleccionó la zona superior de la berenjena (este sector prácticamente no contiene semillas) se lo peló y fraccionó, para luego homogeneizarlo con agua bidestilada en un Omnimixer (Dupont Instruments

Sorvall® Omni-Mixer). Posteriormente se procedió a medir el pH resultante en un pHmetro -HACH, EC30-. Los homogenatos se efectuaron por duplicado.

#### **I - 8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se tomaron muestras de endocarpio, mesocarpio y exocarpio de frutos, al inicio y luego de 8 y 15 días de almacenamiento a 0 y 10°C. Una delgada porción transversal perteneciente a la zona ecuatorial del fruto se cortó con bisturí, se la sumergió en el fijador (glutaraldehído 6% en buffer fosfato pH 7,4) y se procedió a la obtención de secciones de 2 mm<sup>2</sup>. Se conservó en fijador 24 h a 4°C. Posteriormente el tejido se lavó con el mismo buffer fosfato por 1 h a temperatura ambiente y se fijó con solución OsO<sub>4</sub> 2% en agua por 1 h a temperatura ambiente. Se realizó un segundo lavado por 1 h, se lo deshidrató gradualmente en soluciones etanol:agua a temperatura ambiente en concentraciones crecientes de etanol 25, 50, 75 y 100% por 30 min cada uno. Luego se traspasó a acetona 50% y se efectuaron dos deshidrataciones más de 30 min con acetona 100%. Se efectuó el secado por punto crítico, utilizando dióxido de carbono como fluido intermediario, en un equipo POLAROM (England). Se montaron sobre portamuestras de bronce con cinta adhesiva doble faz y se realizó una evaporación de oro (de aproximadamente 300 Å) en un sputter coater modelo 3, 91000 de PELCO. Finalmente se observaron en un Microscopio de barrido JEOL 35 CF (Tokio, Japón) operando a un voltaje de 5 kV.

Se analizaron al menos 3 muestras de la zona ecuatorial o centro.

#### **I - 9. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Se tomaron muestras de endocarpio, mesocarpio y exocarpio de frutos, al inicio y luego de 8 y 15 días de almacenamiento a 0 y 10°C. Se procedió al cortado, fijación, lavado y deshidratación de la misma manera que para la técnica de SEM. EL último paso de la deshidratación se realizó mediante la inclusión del tejido en distintas concentraciones de acetona y resina Spurr, respectivamente. Primero: 3 partes de acetona: 1 parte de resina,

luego 2:2; 1:3 y por último, tres veces acetona 100% por 30 min cada paso. Luego de embeber la muestra con resina, se cortaron secciones ultrafinas de 800 Å de espesor con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo LKB, (Alemania). Las secciones se montaron sobre grillas de cobre de 200 mesh sin film de formar. Se realizó el contraste con citrato de plomo, pH 12 por 20 min y acetato de uranilo al 3% en etanol por 45 min. Las secciones se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar en cápsula de Petri. Finalmente se tomaron micrografías empleando un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL 100 CXII (Tokio, Japón) a 80 kV.

#### **I - 10. Análisis estadístico**

En todas las experiencias se empleó un diseño factorial. Los resultados fueron procesados mediante un ANOVA y las medidas comparadas por el test LSD con una significancia de 0,05 usando el software SYSTAT.



## I- RESULTADOS

### I-1. Pérdida de peso durante el almacenamiento refrigerado

Se evaluó la pérdida de peso de cada fruto antes y después del tratamiento a las distintas temperaturas.

Como se puede observar en la figura I-5, el comportamiento que presentaron los frutos ante la exposición a 0 y 5°C fue similar ( $p>0,05$ ). Los mismos tuvieron una pérdida de peso cercana a 0,8% al final del almacenamiento.

A 10°C (fig. I-5), el porcentaje fue mayor respecto de las temperaturas anteriores ( $p<0,05$ ), pero no superó el 1,5% de pérdida de peso al final del almacenamiento. Estos frutos mantuvieron una calidad comercial buena al final de los 15 días de tratamiento.

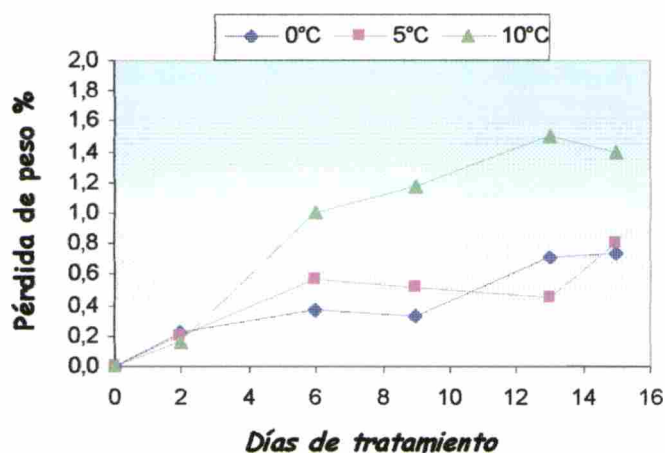


Figura I-5: Pérdida de peso porcentual a 0, 5 y 10°C durante los días de almacenamiento.  $LSD_{0,05}=0,23$

### I-2. Evolución del daño por frío

Se evaluó el daño por frío tanto en la zona central o ecuatorial como en la zona debajo del cáliz, dado que ésta presentó un color inicial distinto a la anterior.

La secuencia de aparición de los síntomas de daño se puede ordenar de la siguiente manera: a) *pérdida de brillo superficial, opacidad*, b) *decoloración superficial*: la piel debajo del cáliz (zona cáliz) es inicialmente púrpura-rojiza y comienza a tornarse más clara y blancuzca; en la zona ecuatorial o centro el color inicial es púrpura-negro y termina siendo púrpura rojizo oscuro, c) *pardeamiento de semillas*, d) *desarrollo de punteado*: comienzan siendo pequeños puntos oscuros y hundidos en la piel del fruto y luego van logrando mayor tamaño hasta que finalizan como escaldaduras superficiales, e) *pardeamiento de la pulpa*: se desarrollan zonas marrones en la pulpa del fruto, f) *escaldaduras superficiales*: son áreas hundidas en la piel del fruto, de color marrón y de apariencia seca.

En la figura I-6 se expone la variación hallada en los ID de los frutos en función de los distintos días de tratamiento. En ella podemos ver que los valores de ID se incrementaron en forma abrupta a 0°C; mientras que a 5°C se lograron menores ID. La primera manifestación fue la decoloración de los frutos tanto en la zona centro como cáliz a ambas temperaturas a partir del día 2, siendo más pronunciada en frutos almacenados a 0°C. También se evidenció la pérdida de brillo superficial al día 6 a 0°C y al día 9 a 5°C. A los 6 (ID 2,5) y 9-13 días (ID 3,2-4,6) a 0°C, surgieron manifestaciones internas de daño del fruto tales como pardeamiento en semilla y desarrollo de zonas marrones en el tejido, respectivamente, mientras que en frutos expuestos a 5°C aparecieron luego de 9 (ID 2,5) y 15 días (ID 3,0). Respecto a la aparición de síntomas externos de daño tales como punteado y posterior desarrollo de escaldaduras, éstos surgieron a los 9 y 13 días a 0°C, respectivamente. A 5°C se observaron a los 13 (ID 2,8) y 15 días (ID 3,0), pero en forma leve y sólo en la zona cáliz. Cuando los frutos de ambas temperaturas, a cada día de muestreo, fueron transferidos a 20°C por 24 h se evidenció un incremento de los síntomas de daño y por ende de los ID. A ambas temperaturas la zona cáliz fue afectada más rápidamente y el daño fue más severo respecto de la zona centro.

En frutos almacenados a 10°C, el comportamiento fue totalmente distinto ya que no hubo manifestaciones de daño. Las únicas alteraciones percibidas fueron las de senescencia.

Finalmente se puede decir que luego de los 15 días de almacenamiento:

- A 0°C el daño fue severo. *Calidad final: desechable.*
- A 5°C la evolución del daño fue más tardía. *Calidad final: Regular.*
- A 10°C no hubo desarrollo de daño. *Calidad final: Buena.*

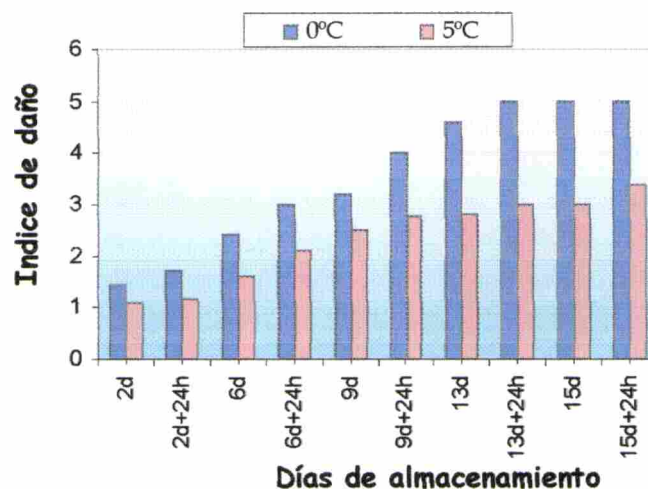


Figura I-6: Índice de daño de frutos almacenados a 0° y 5°C. Se muestran los valores a la salida de cámara y luego de 24 h de permanecer a 20°C.  $LSD_{0,05}=0,26$

A efectos de comprender la incidencia de las bajas temperaturas se muestran fotografías captadas en distintos días del almacenamiento refrigerado en las (fig. I-7 a I-10).

En la figura I-7 se puede apreciar, a tiempo inicial, el tamaño del fruto y la diferencia de tonalidades mencionada entre la zona "centro" y la zona "cáliz". La evolución del daño a 0°C luego de los 13 días a dicha temperatura y las 24 h posteriores a 20°C mostró daño superficial a través de punteado en zonas "cáliz" y "centro" y escaldaduras también en ambas zonas, siendo la zona cáliz la más afectada (fig. I-8), y daño interno manifiesto como pardeamiento de semillas y pulpa elevados (fig. I-9). A los 15 días y 24h (fig. I-10) la calidad fue desechable, con síntomas severos de daño por frío y presencia de desarrollo fúngico elevado en el cáliz. A 5°C se observó que luego de los 13 días y las 24 h posteriores no existió daño superficial (fig. I-8), mientras que se verificó daño interno (fig. I-9), pero únicamente como pardeamiento de semillas. Luego de 15 días

y 24 h (fig. I-10) el daño evolucionó de tal manera que se percibió punteado superficial en la zona "cáliz" y en una zona que se extiende más allá del cáliz pero que poseía un color similar a éste. A 10°C no hubo desarrollo de daño interno (fig. I-9), como así tampoco daño superficial (fig. I-8 y I-10) a lo largo de los 15 días de exposición.



Figura I-7: Frutos enteros a tiempo inicial, con escala métrica en cm.

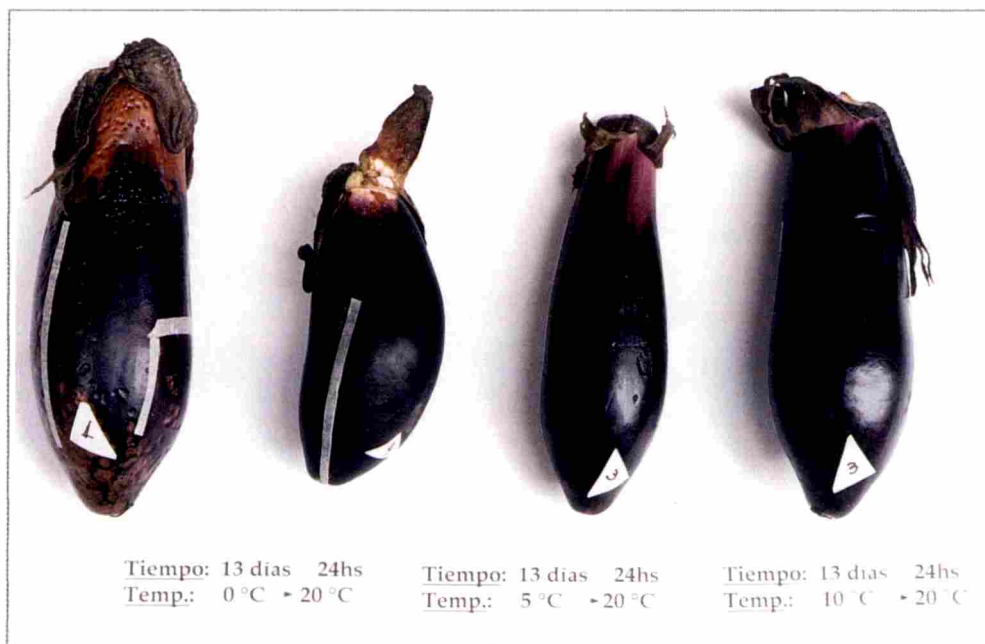


Figura I-8: Frutos enteros luego del almacenamiento por 13 días a 0, 5, 10°C y 24 h a 20°C.

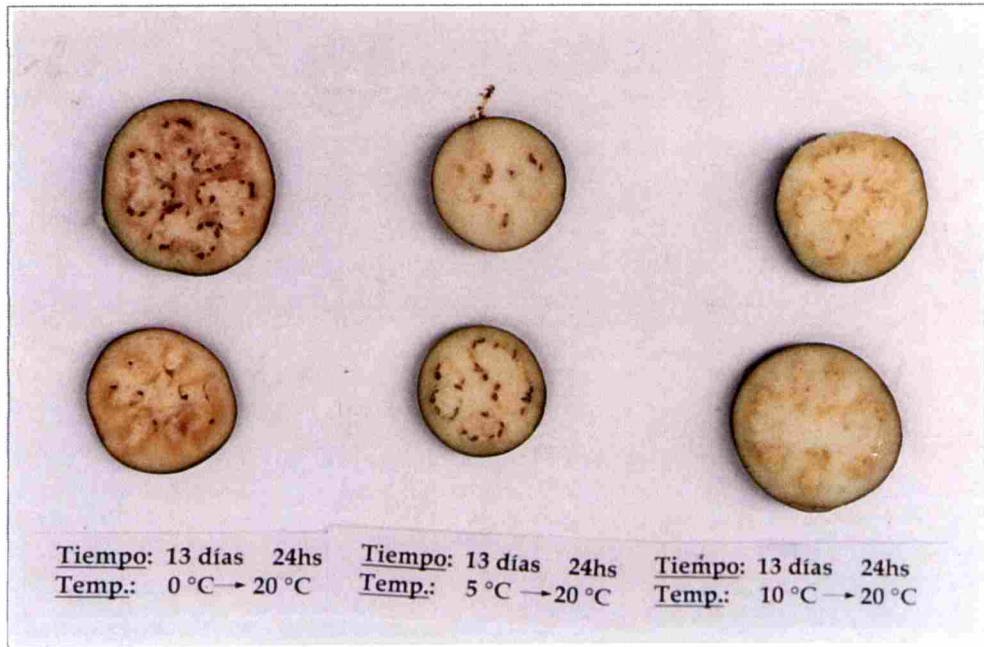


Figura I-9: Discos pertenecientes a la zona ecuatorial de frutos almacenados 13 días a 0, 5, 10°C y 24 h a 20°C.

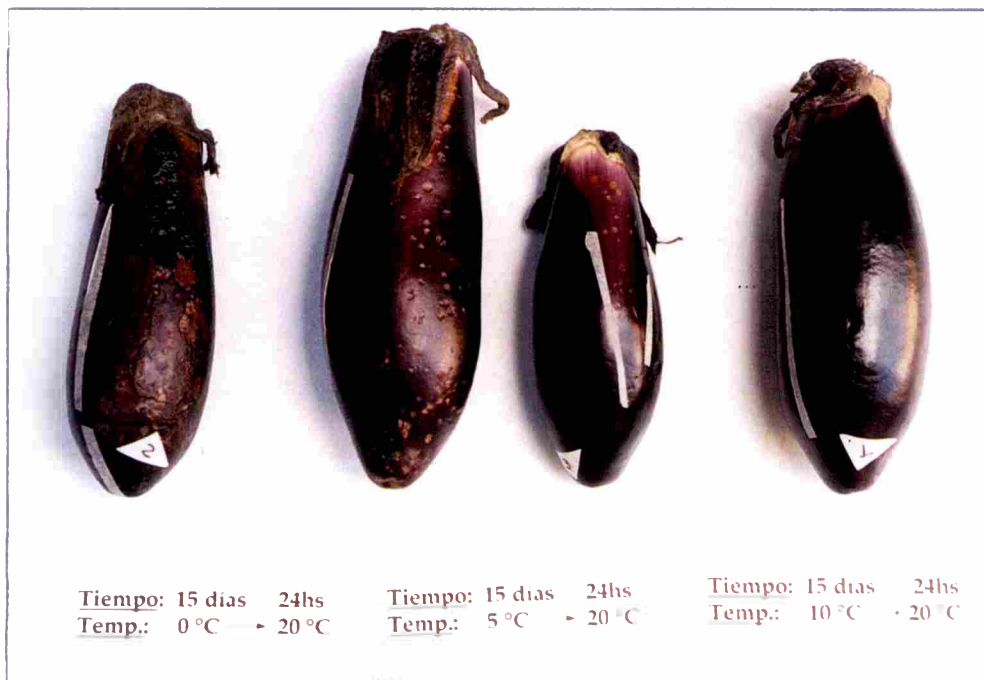


Figura I-10: Frutos enteros luego del almacenamiento por 15 días a 0, 5, 10°C y 24 h a 20°C.

### I-3. Evolución del pardeamiento de la pulpa

El valor de  $L_0$  medido en la pulpa del fruto es una determinación objetiva de la evolución del pardeamiento del tejido. Valores de  $L_0$  superiores a 86 denotan pulpa en buen estado y blancuzca; valores entre 81 y 82 son obtenidos cuando existe pardeamiento sólo de semillas; valores cercanos a 78 indican pardeamiento incipiente tanto de pulpa como de semillas y valores inferiores a 73 son obtenidos cuando el pardeamiento de semillas y pulpa en su conjunto es elevado, pudiendo el tejido ser de textura jugosa o corchosa.

Durante el almacenamiento a 10°C, los valores de  $L_0$  permanecen superiores a 87, tanto a la salida de cámara como luego del pasaje a 20°C (datos no mostrados). Esto demuestra una alta luminosidad del tejido y por tanto una pulpa sin pardeamiento.

En la figura I-11 se muestra la evolución del valor de  $L_0$  para frutos almacenados a 0 y 5°C. A ambas temperaturas, los valores de  $L_0$  fueron disminuyendo con el avance del tiempo de almacenamiento. La disminución de  $L_0$  fue más pronunciada a 0°C que a 5°C ( $p < 0,05$ ) demostrando una mayor evolución del pardeamiento. También el pasaje a 20°C provocó una disminución del valor de  $L_0$  respecto de su correspondiente valor a la salida de cámara, siendo esta disminución más marcada en frutos almacenados a 0°C. Los valores hallados a ambas temperaturas se correspondieron con los síntomas de daño interno (pardeamiento de semillas y pulpa) descriptos anteriormente.

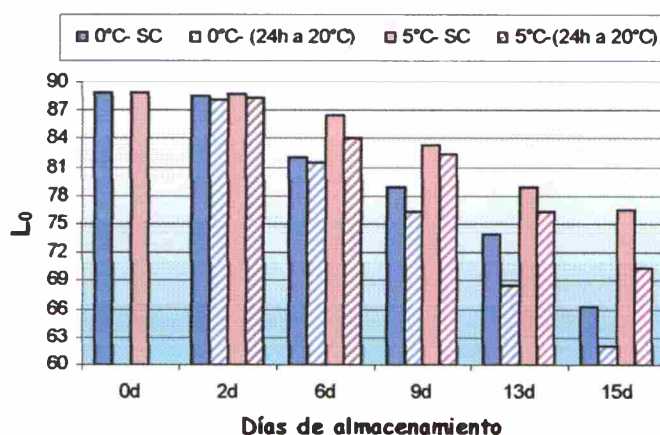


Figura I-11: Evolución del valor de  $L_0$  (pardeamiento del tejido interno) durante el almacenamiento a 0 y 5°C durante 15 días: a la salida de cámara (SC) y luego de la transferencia a 20°C por 24 h. LSD = 1,86

#### I-4. Cambios en el potencial de oxidación

El valor del potencial de oxidación ( $\Delta L$ ) da una idea de la capacidad de pardeamiento que posee el tejido. Al inicio, el valor de  $\Delta L$  fue 6,2.

Durante el almacenamiento a 10°C el valor de  $\Delta L$  disminuyó hasta el día 6 alcanzando un valor 33% menor ( $p < 0,05$ ) respecto al inicial (datos no mostrados). Luego, dicho valor se mantuvo constante hasta el final del almacenamiento. Los valores hallados luego del pasaje de los frutos a 20°C no variaron significativamente respecto de sus correspondientes valores a la salida de cámara (datos no mostrados). Esto demostró que el tejido seguía teniendo una alta capacidad de oxidación durante el almacenamiento.

A 0°C (fig. I-12), también se verificó una disminución hasta el día 6 de almacenamiento, pero esta vez el valor hallado fue 45% menor respecto al inicial. Luego, los valores se mantuvieron prácticamente constantes hasta el final del almacenamiento. El pasaje a 20°C provocó una disminución ( $p < 0,05$ ) de los  $\Delta L$  en todos los días de muestreo. A juzgar por estos valores y los bajos niveles de  $L_0$  descriptos anteriormente sobre el final del almacenamiento, una vez que el tejido se hallaba pardeado habría disminuido su capacidad para seguir oscureciéndose cuando fue dejado al aire.

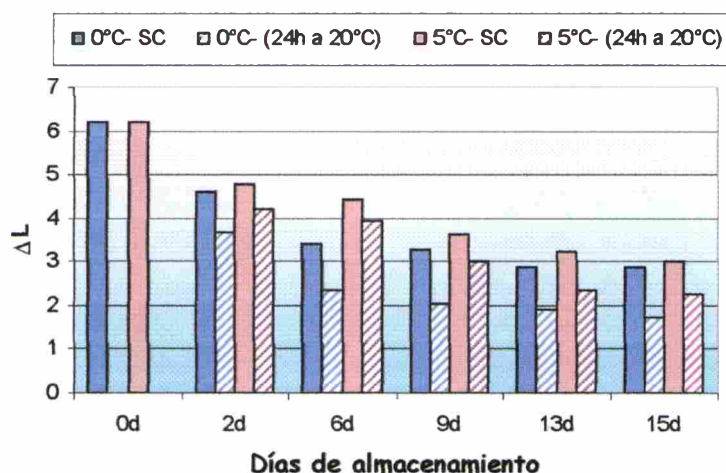


Figura I-12: Cambios en el potencial de oxidación ( $\Delta L$ ) de frutos almacenados a 0 y 5°C: a la salida de cámara (SC) y luego de la transferencia a 20°C por 24 h. LSD = 0,65

A 5°C (fig. I-12), la evolución del  $\Delta L$  fue prácticamente comparable al comportamiento observado a 0°C, siendo únicamente diferente al día 6, donde el valor de  $\Delta L$  a 5°C fue mayor respecto del valor a 0°C y comparable al valor hallado a 10°C (33% inferiores al inicial). Esto indicó que, a este tiempo, el almacenamiento a 5°C aún no causaba daño por frío. Cuando los frutos se transfirieron a 20°C por 24 h, los valores de  $\Delta L$  obtenidos también fueron menores respecto de aquellos a la salida de cámara, y fueron diferentes a los valores de  $\Delta L$  obtenidos a 0°C sólo luego de 6 y 9 días + 24 h a 20°C.

#### **I-5. Cambios en la pérdida de electrolitos**

La medida de pérdida de electrolitos por parte del tejido vegetal ha sido usada como una medida indirecta del daño en membrana (Wilson y McMurdo, 1981), y de esa manera permite determinar la intensidad del daño por frío (Murata, 1989). En esta experiencia sólo se analizó la temperatura que no causó daño (10°C) y aquella que provocó mayor daño (0°C). Dado que, aparentemente, la sección cáliz sufre mayor daño por frío, la pérdida de electrolitos se determinó en ambas secciones. El valor inicial fue de 3,85 y 3,89% para la sección centro y cáliz, respectivamente.

A 10°C (fig. I-13), se observó una pequeña variación a lo largo del almacenamiento tanto en zona centro como en cáliz, sugiriendo que la pulpa de todo el fruto no había sufrido daño celular.

A 0°C (fig. I-13), ambas zonas mostraron un incremento hacia el día 6 de almacenamiento alcanzando un valor cercano al doble que el inicial. Luego, la zona cáliz mostró una evolución más rápida ( $p < 0,05$ ) que la zona centro, ya que al día 13 los valores fueron 9,5 y 5,0 veces superior al inicial, respectivamente. Posteriormente, los niveles se mantuvieron relativamente estables hasta el día 15 ( $p > 0,05$ ). El incremento observado luego del día 6 coincide con el aumento en los síntomas de daño interno, comentados en la sección I-2. Los mayores valores observados en la pérdida de electrolitos de la zona cáliz corroboraron el mayor daño sufrido por esta zona.



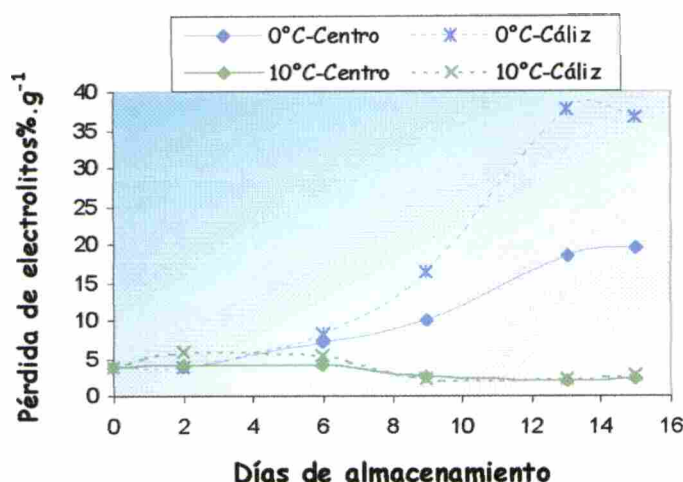


Figura I-13: Cambios de la pérdida de electrolitos de zona centro y cáliz de frutos almacenados a 0 y 10°C.  $LSD_{0,05}=0,77$

### I.6. Variación de la acidez iónica

El valor promedio de pH hallado a tiempo inicial resultó ser 5,5. Dicho valor es algo mayor a los valores de 4,5 y 4,9 hallados por López-Andréu y col (1988) y Esteban y col. (1989 a y b, 1992), respectivamente, en la variedad Black Round de berenjena.

Como puede observarse en la figura I-14, el pH aumentó ligeramente al día 2 de almacenamiento a 0, 5 y 10°C. Posteriormente, los valores encontrados para 5 y 10°C se mantuvieron constantes ( $p>0,05$ ) e iguales a 6,0 hasta el final del almacenamiento. A 0°C el aumento del pH persistió, prácticamente, hasta el día 13 para luego mantenerse constante en un valor de 6,4.

Al analizar el comportamiento de los frutos luego de la salida de cámara y expuestos 24 h a 20°C (datos no mostrados) se halló en todos los casos una ligera disminución del pH.

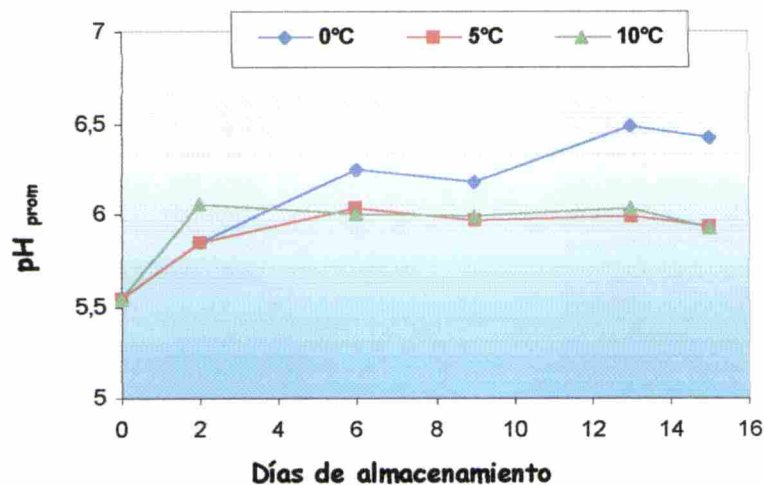


Figura I-14: Evolución de la acidez iónica (pH) de los frutos almacenados a 0, 5 y 10°C, al momento de salir de cámara, en función de los días de almacenamiento.  $LSD_{0,05}=0,35$

### I.7. Análisis por microscopía

Se examinó por SEM, tejido fresco de berenjenas previo a su posterior almacenamiento a bajas temperaturas. Las células parenquimáticas (fig. I-15a) poseen un ordenamiento compacto, con poco espacio entre ellas, como también fue mostrado por Otero y col. (1998) en tejido fresco de otra variedad de berenjena. En la figura I.15b, gracias a la mayor magnitud empleada, puede apreciarse que la pared celular posee un aspecto ondulante, pero sin pliegues. Por TEM el tejido mostró (fig. I-15c) células parenquimáticas de gran dimensión, aunque si bien sus tamaños son distintos, en todas ellas puede apreciarse una buena integridad celular. Poseen la redondez característica de células turgentes. Las vacuolas, también de gran tamaño y con tonoplasto intacto, comprimen las organelas contra la pared celular, dejando ver un delgado citoplasma periférico. En la figura I-15d se observa la laminilla media como una región de mayor densidad entre las paredes primarias de dos células adyacentes y el citoplasma confinado a una delgada zona adyacente a la pared celular.

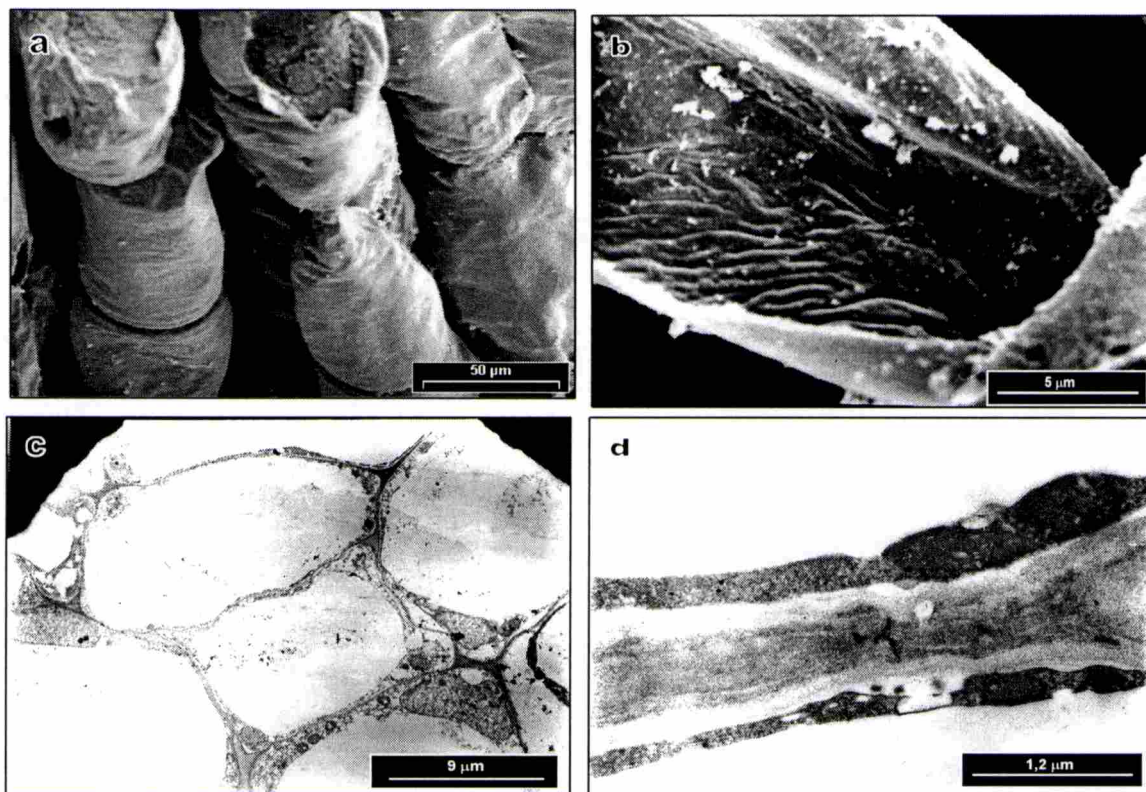


Figura I-15: Tejido perteneciente a berenjenas, previo al almacenamiento a baja temperatura. (a y b) micrografías de SEM, (a) x 600, (b) x 6.000; (c y d) micrografías de TEM, (c) x 2.700, (d) x 20.000

Luego de 8 días de almacenamiento a 10°C, las micrografías de SEM muestran una estructura celular más colapsada (fig. I-16a) y con presencia de pliegues en la pared celular, lo cual puede apreciarse notoriamente en la figura I-16b gracias a la mayor magnitud de la micrografía.

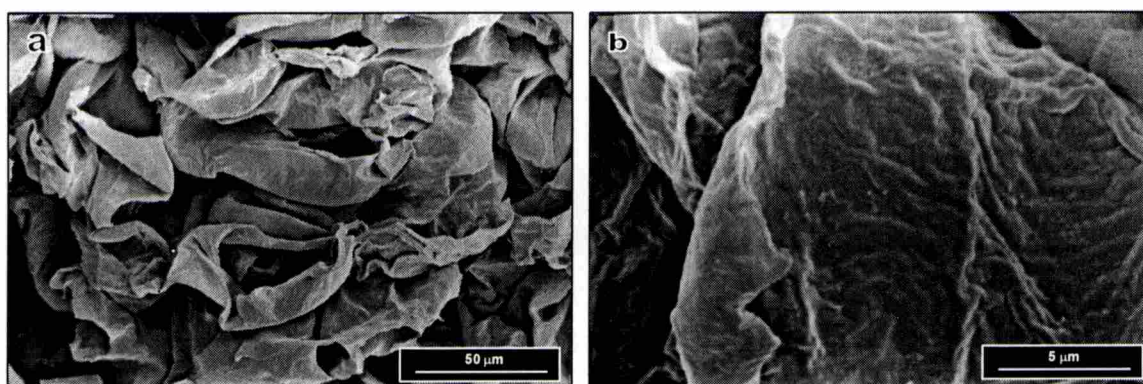
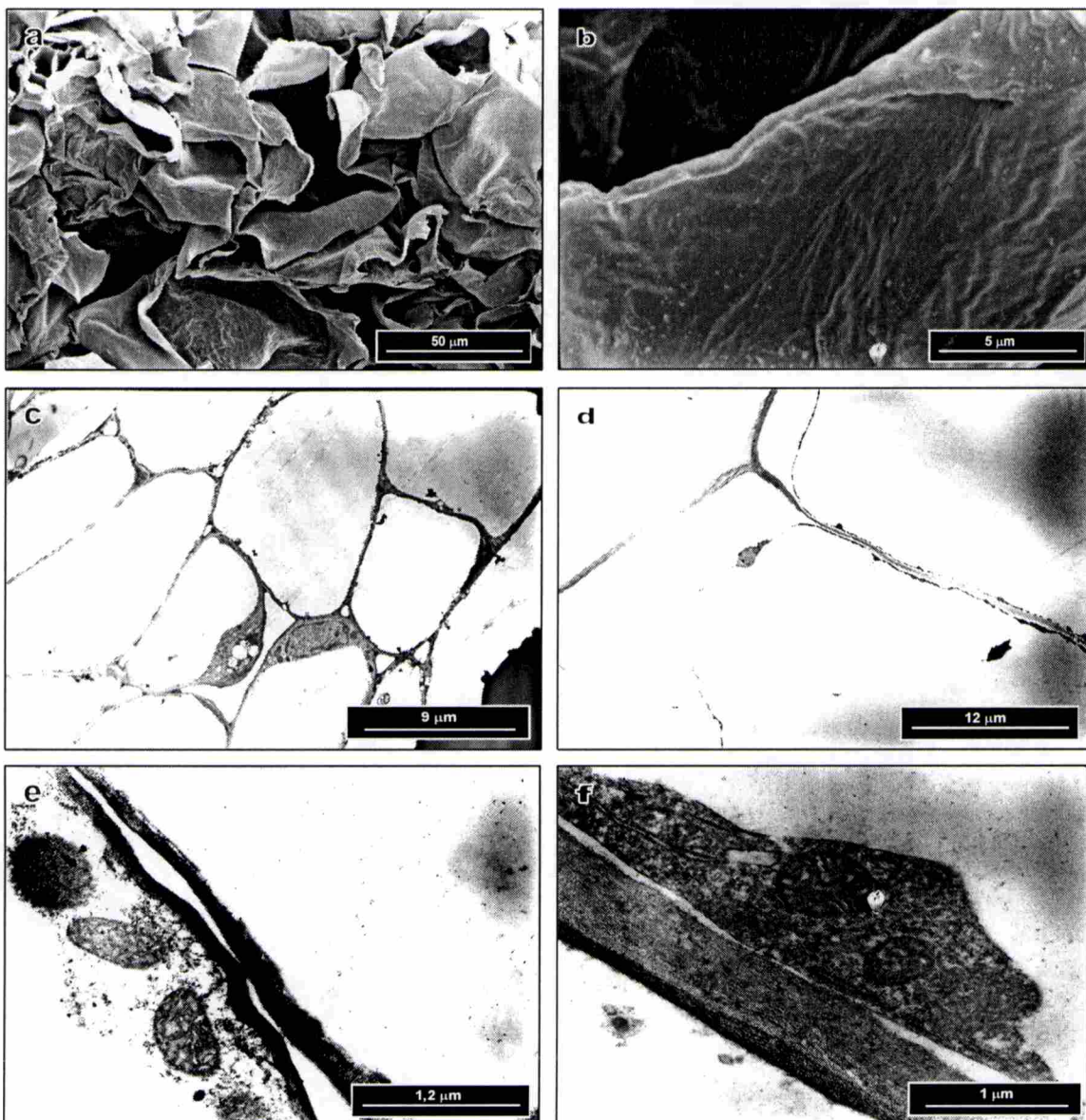


Figura I-16: Tejido de berenjenas almacenadas a 10°C durante 8 días. (a y b) micrografías de SEM, (a) x 600, (b) x 6.000

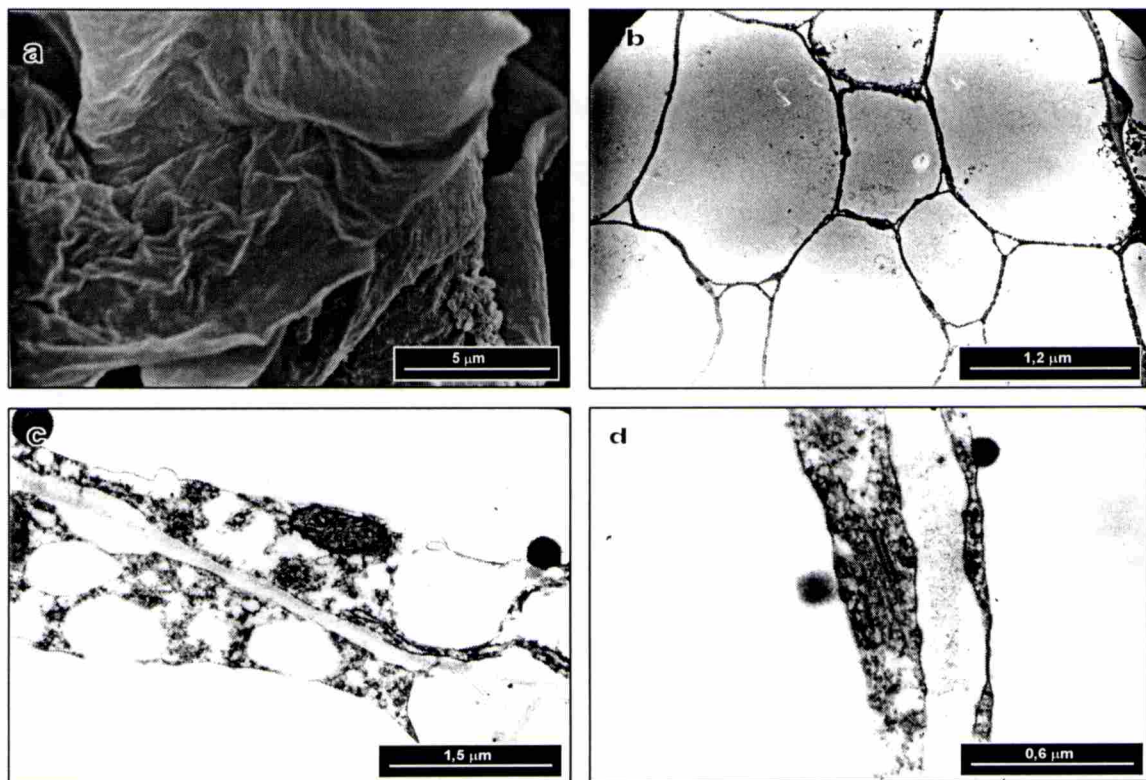
El análisis de los frutos expuestos 8 días a 0°C, si bien muestra una disposición colapsada de las células (fig. I-17a), éstas no muestran prácticamente pliegues cuando son observadas a mayor magnitud (fig. I-17b). Probablemente, esto se deba a que los frutos almacenados a 0°C presentaron menor deshidratación y pérdida de peso (sección I-1) respecto de los frutos almacenados a 10°C. El análisis por TEM de frutos almacenados 8 días a 0°C muestra la aparición de espacios intercelulares (fig. I-17c) y en algunos casos ya



**Figura I-17:** Tejido perteneciente a berenjenas almacenadas a 0°C durante 8 días. (a y b) micrografías de SEM, (a) x 600, (b) x 6.000; (c - f) micrografías de TEM, (c) x 2.700, (d) x 2.000, (e) x 20.000, (f) x 27.000

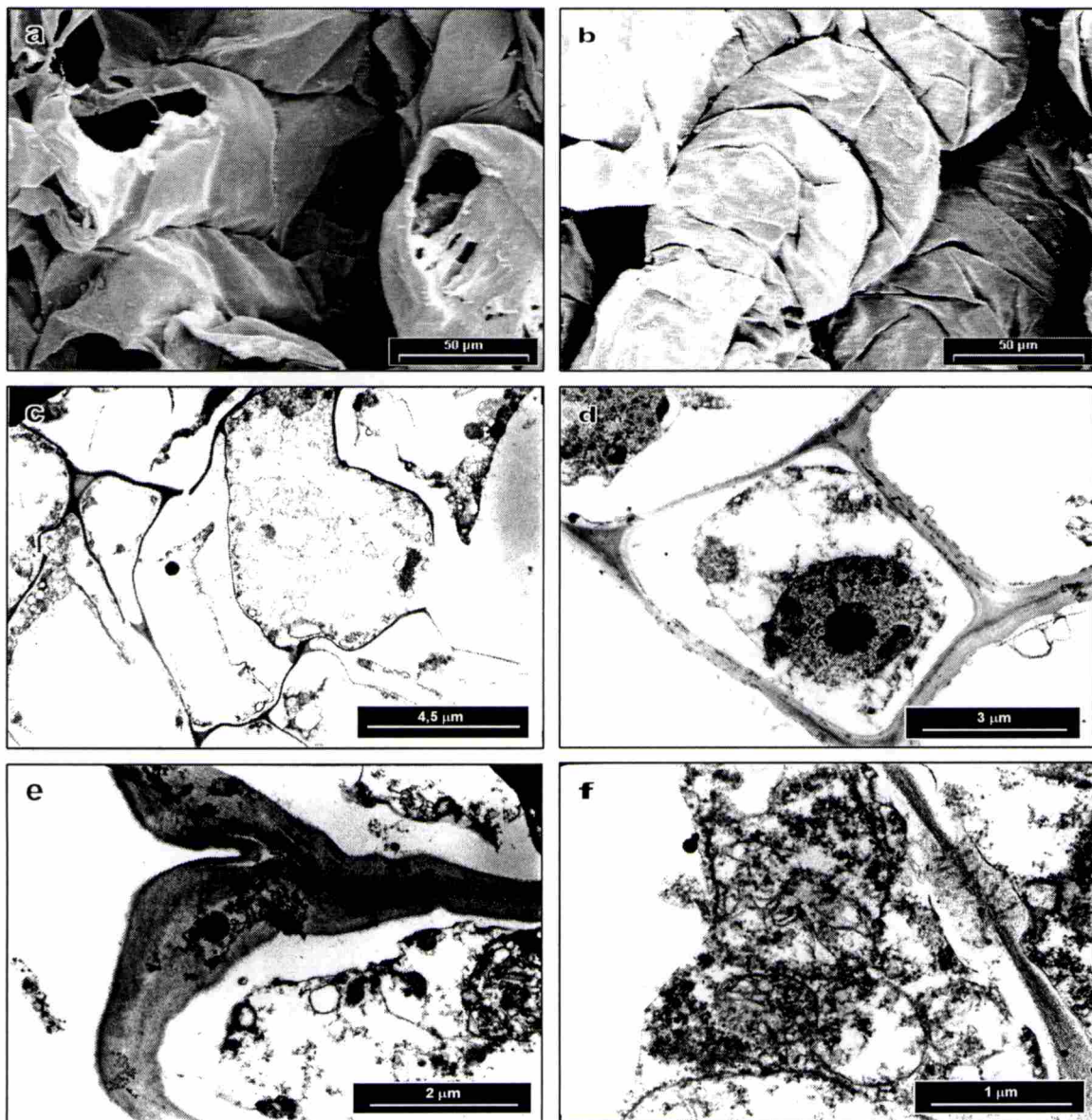
es visible el alejamiento de la membrana plasmática y el citoplasma respecto de la pared celular (fig. I-17d). A este tiempo de almacenamiento los frutos presentaban un daño importante debido a la baja temperatura, por lo tanto estas alteraciones celulares observadas podrían deberse al daño por frío. Luza y col. (1992) informaron observaciones similares al analizar tejido de duraznos dañados por frío. La figura I-17e, de mayor magnitud, permite observar la separación entre células, perdiendo así cohesividad entre ambas. A este tiempo de almacenamiento distintas organelas están aún conservadas (fig. I-17 e y f). Si bien en estas micrografías el tonoplasto se hallaba intacto, no fue así en otras micrografías tomadas de la misma muestra.

A los 15 días de almacenamiento a 10°C, la pared celular de los frutos observada por SEM poseía la estructura mostrada en la figura I-18a. Gran cantidad de pliegues y una apariencia blanda reflejaron el alto nivel de deshidratación de los frutos. La observación del tejido por TEM (fig. I-18b) mostró espacios intercelulares como consecuencia de la



**Figura I-18:** Tejido perteneciente a berenjenas almacenadas a 10°C durante 15 días. (a) micrografía de SEM, x 6.000; (b - d) micrografías de TEM, (b) x 2.000, (c) x 14.000, (d) x 40.000

senescencia normal del fruto. Las células mostraron un contorno algo irregular al perder cierta cohesividad entre las mismas. Cuando el tejido fue observado a mayor magnitud (fig. I-18 c y d) se encontró una baja densidad de la laminilla media, debido esto probablemente al proceso de senescencia. El tonoplasto se observó intacto y compactando al citoplasma en forma adyacente a la pared celular. Se observan también distintas organelas en forma conservada.



**Figura I-19:** Tejido perteneciente a berenjenas almacenadas a 0°C durante 15 días. (a y b) micrografías de SEM, (a) x 600, (b) x 600; (c - f) micrografías de TEM, (c) x 5.000, (d) x 8.000, (e) x 10.000, (f) x 27.000

Cuando los frutos fueron almacenados 15 días a 0°C y observados por SEM se denotó falta de turgencia en las células (fig. I-19 a y b) y en algunas fue muy evidente el desgarro de la pared celular (fig. I-19a). A este tiempo de almacenamiento el daño por frío era severo (sección I-2), y las micrografías de TEM mostraron que el daño por frío era muy notorio llegando a producir, en algunos casos, ruptura celular (fig. I-19c) y contracción del citoplasma y membrana plasmática en otras (fig. I-19 d y e). En estas figuras es evidente también la dispersión de restos celulares. En la micrografía de mayor magnitud (fig. I-19e), se aprecia que ciertas células también presentaron tanto contorno como espesor altamente irregular, incluso pared celular vesiculada en algunos casos. Cabe destacar que si bien, hubo disolución parcial de la laminilla media, ésta presentó mayor densidad respecto de aquella observada a 10°C (fig. I-18c y I-18d).

---

## I- DISCUSION

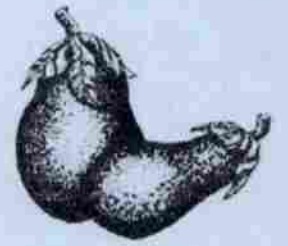
Las berenjenas Money Maker N°2 no presentaron daño por frío al ser almacenadas durante 15 días a 10°C. Sin embargo, las mismas mostraron mayor pérdida de peso respecto de aquellos frutos almacenados a 0°C, lo cual derivó en la disminución de la turgencia de la células a lo largo del almacenamiento, observada por SEM (fig. I-16a, I-16b y I-18a) y TEM (fig. I-18b). También fue notorio el deterioro asociado a la senescencia del fruto y a nivel ultraestructural, la aparición de espacios intercelulares (fig. I-18b) y degradación parcial de la laminilla media (fig. I-18c y I-18d).

Los frutos almacenados a 0 y 5°C mostraron síntomas de daño por frío, aunque la exposición a 5°C causó daño en forma tardía respecto de 0°C. La correlación hallada para el avance de los valores de ID con el tiempo de almacenamiento fue lineal, obteniéndose velocidades de incremento de ID iguales a 0,264 ( $r=0,999$ ;  $s_b=0,006$ ) para 0°C y 0,137 ( $r=0,992$ ;  $s_b=0,008$ ) para 5°C. De esta manera puede verse que la velocidad de desarrollo del daño a 0°C fue prácticamente el doble respecto de la observada a 5°C. Los síntomas de daño comenzaron a visualizarse en forma más notoria a partir del día 6 de almacenamiento a 0°C y día 9 a 5°C. Esteban y col., (1989a), trabajando con berenjenas cv Black Round almacenadas a 5°C en películas perforadas, observaron aparición de punteado superficial luego de 13 días; mientras que Lopez-Andréu y col. (1988) hallaron escaldaduras, decoloración y pérdida de brillo luego de 18 días. En nuestro trabajo, las manifestaciones de daño en la pulpa fueron evidenciadas por la disminución del valor de  $L_0$  y  $\Delta L$ . Esta correspondencia entre el incremento del pardeamiento del tejido y la disminución de  $\Delta L$  fue mencionada anteriormente por Larrigaudiere y col. (1998) trabajando en peras. A 0°C se observó un aumento en el pH debido al desarrollo del daño por frío, lo cual también fue informado por Esteban y col. (1989 a y b), trabajando con berenjenas cv Black Round. También, a 0°C el aumento de la pérdida de electrolitos mostró que la evolución del daño por frío se iba intensificando con el tiempo de almacenamiento y que la zona más afectada resultó ser la zona cáliz (como se había mencionado en la sección I.2). A esta temperatura, la pérdida de electrolitos (PE) aumentó de acuerdo a la expresión de crecimiento  $PE=\alpha/(1+\beta e^{kt})$  donde  $\alpha$  es el valor límite a



## I - CONCLUSIONES

- En berenjenas Money Maker N°2 no se observó daño por frío cuando las mismas fueron almacenadas a 10°C durante 15 días.
- Se observó un incremento lineal de los síntomas de daño por frío con el tiempo de almacenamiento a 0 y 5°C. La velocidad de desarrollo del daño fue 0,264 ( $r=0,999$ ) a 0°C y 0,137 ( $r=0,992$ ) a 5°C.
- La manifestación del daño por frío se observó a través de la pérdida de brillo superficial, decoloración de la piel de la zona debajo del cáliz, pardeamiento en semillas y pulpa, aparición de zonas punteadas y desarrollo de escaldaduras en la piel de todo el fruto.
- El daño por frío se evidenció, además, en una disminución de  $L_0$  y  $\Delta L$ , y mayor pérdida de electrolitos.
- El almacenamiento de los frutos a 0°C provocó un aumento de la acidez iónica (pH) del tejido.
- A 0°C se observaron alteraciones ultraestructurales tales como disminución de la densidad de laminilla media, aparición de espacios intercelulares, contracción de la membrana plasmática respecto de la pared celular; y cuando el daño era muy avanzado se observó ruptura de tonoplasto, pared celular vesiculada e incluso ruptura celular.



## ***Capítulo II***

# ***Biosíntesis de etileno frente al estrés provocado por las bajas temperaturas***

## II - INTRODUCCION

### II – 1. PRODUCCIÓN DE ETILENO

El etileno es considerado una hormona de la maduración. Su producción se da en toda la planta en mayor o menor grado, esto incluye hojas, tallos, raíces, flores, fruto, tubérculos. En tejidos vegetales, puede ser inducida por factores externos tales como: golpes, cortes, daño por frío, aplicación de auxinas, sequía e inundación (Yang y Pratt, 1978).

Si bien el etileno promueve la maduración y caída de los frutos, también se conoce su regulación en la senescencia de flores y caída de pétalos y hojas. Por otro lado, también actúa como promotor del crecimiento de plantas semiacuáticas (Kende, 2001) o como inhibidor del crecimiento de plantas terrestres: regula el crecimiento asimétrico de las puntas de hipocotiledones en plantas dicotiledóneas o el crecimiento agravitrópico de los tallos.

#### II - 1.1. ¿Cuándo se descubrió al etileno?

El etileno ha sido usado en la práctica desde los antiguos egipcios, quienes poseían un gas que estimulaba la maduración de los higos. Los antiguos chinos quemaban inciensos dentro de habitaciones cerradas para madurar las peras. También algunos productores poseían limones demasiado verdes como para ser aceptados en el mercado y para desarrollar un color amarillo uniforme colocaban los limones en habitaciones cerradas con una estufa de kerosene. Siguiendo esta pista pronto se halló que el factor importante en el proceso de maduración no era el calor sino una pequeña cantidad de gas “etileno” que se producía cuando el kerosene era quemado. En 1901, un científico ruso llamado Dimitry Neljubow mostró que el componente activo era el etileno. En 1917, Doubt descubrió que el etileno causaba la abscisión. Y recién en 1934, Gane informó que las

plantas generaban etileno. En 1935, Crocker propuso que el etileno era una hormona responsable de la maduración de los frutos.

## II - 1.2. Biosíntesis de etileno

Fue demostrado en tejido de manzanas, que la metionina (Met) es el precursor del etileno, donde el C-1 de la Met es convertida en  $\text{CO}_2$ , C-2 en ácido fórmico, C-3 y C-4 en etileno (Yang, 1981). En tejido de manzana fue demostrado que se mantenía una velocidad de producción de etileno por largos períodos, mientras que el nivel de Met era relativamente bajo. Es claro que para que se siguiera produciendo etileno el grupo sulfuro de la Met debía ser reciclado (Yang, 1981).

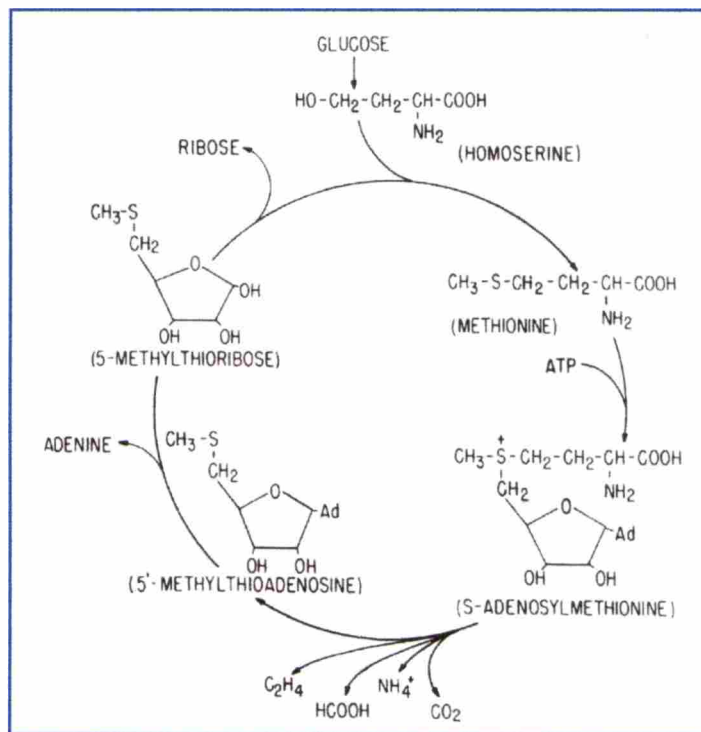


Figura II-1: Ciclo involucrado en la biosíntesis de etileno (Extraído de Friend (1981) en "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables"- Capítulo 4, pág. 91).

Estudios posteriores llevaron a demostrar el esquema resumido de la figura II-1, donde Met es activada en primera instancia por ATP para formar S-adenosilmetionina (SAM) a través de la actividad catalítica de S-adenosilmetionina sintetasa (EC 2.5.1.6). Luego, SAM se fragmenta para dar etileno, 5'-Metiltioadenosina (MTA) y otros productos. MTA es hidrolizada posteriormente a Metiltiorribosa y ésta última cierra el ciclo al volver a generar Met. Comparando la estructura de SAM con la de etileno, es evidente que no es uno sólo el paso que lleva de uno a otro.

En estudios hechos sobre la producción de etileno endógeno, se vió que la misma cesaba cuando el tejido era puesto en una atmósfera anaeróbica, pero dicha producción se retomaba si el tejido era llevado a condiciones aeróbicas. Esto denotaba la existencia de un intermediario de reacción que requería oxígeno para llegar a etileno (Burg, 1959). Adams y Yang (1979) examinaron el metabolismo de Met en atmósfera de nitrógeno y hallaron que Met era convertida en Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y 5-metiltiorribosa, pero no en etileno. En presencia de aire ACC era rápidamente convertido en etileno. Entonces fue propuesta la secuencia II-1:



Aminoetoxivinilglicina (AVG) es un conocido inhibidor de reacciones enzimáticas mediadas por piridoxalfosfato que inhibe la reacción SAM-ACC pero no ACC-etileno, demostrando que la enzima que participa en la síntesis de ACC (ACC sintasa - EC 4.4.1.14) es una enzima piridoxal (Adams-Yang, 1979), es decir que posee fosfato piridoxal como co-factor. El esquema de la figura II-2 es sugerido para la reacción que se mencionó (Y<sup>+</sup> denota función sulfónica, Py.E es la enzima piridoxal -ACC sintasa). La formación de ACC es el paso limitante en la biosíntesis de etileno. La enzima ACC sintasa está codificada por una familia multigénica de tamaño medio. Varias de las señales que afectan la síntesis de etileno, resultan en un incremento de la expresión de algún miembro de la familia de genes de la ACC sintasa.

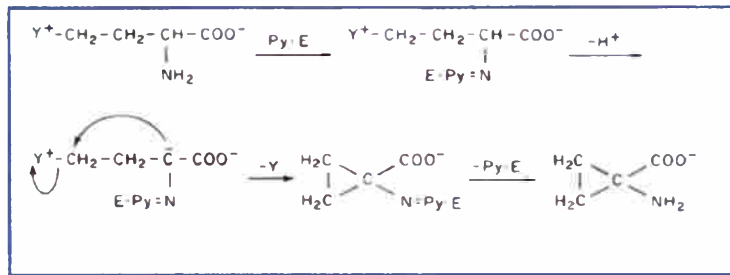


Figura II-2: Esquema de reacción para la formación de ACC (Extraído de Friend (1981) en "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables" - Capítulo 4, pág. 93).

La conversión de ACC en etileno es llevada a cabo por la enzima denominada ACC oxidasa (ACCo) o enzima formadora de etileno. Según los estudios hechos *in-vivo*, esta enzima sería una enzima asociada a membrana, lábil y sujeta a ruptura por químicos y distintos tratamientos (Lieberman, 1979). También es claro que la reacción es oxígeno dependiente (Adams y Yang, 1979). Ante condiciones anaeróbicas la formación de etileno es completamente suprimida. Se ha demostrado que la ACCo aumenta su actividad por el empleo de  $Fe^{+2}$  y  $CO_2$  como co-factores y ascorbato como co-sustrato.

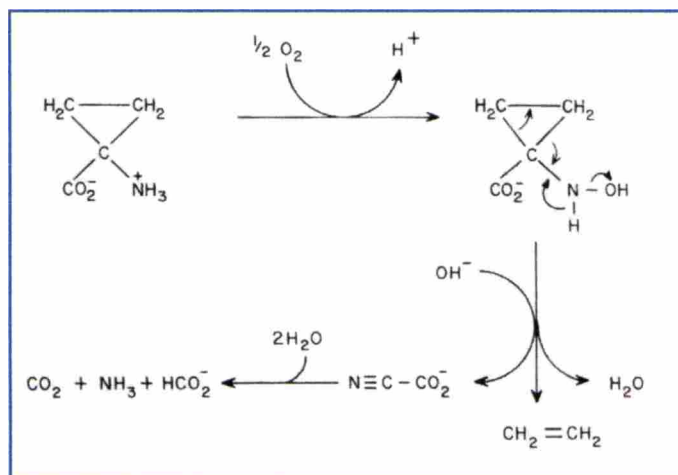


Figura II.3: Esquema de reacción propuesto para la conversión de ACC en etileno catalizada por la ACC oxidasa o enzima formadora de etileno. (Extraído de Friend (1981) en "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables" - Capítulo 4, pág. 94).

Como muestra la figura II-3, el ácido cianocarboxílico es degradado a etileno, CO<sub>2</sub> y HCN. Posteriormente HCN es metabolizado a ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y otros productos. Cameron y col (1979) ensayaron la respuesta del tejido a aplicaciones de ACC, y hallaron que había una respuesta hacia la producción de etileno. Esto sugería que la reacción limitante era SAM-ACC.

### II - 1.3 Etileno: señal y percepción

La acción del etileno involucra a menudo una activación transcripcional. En los últimos años, se ha aprendido mucho acerca de las vías de transducción entre la percepción del etileno y la activación de genes. El etileno es unido por un receptor que se halla localizado en la membrana. El extremo N-terminal del receptor proteico es el responsable de unir al etileno. La porción intracelular de la proteína es una quinasa proteica que se activa cuando se une el etileno (Bleecker y Kende, 2000). Dicho receptor de la quinasa proteica posee un sistema de dos componentes debido a que generalmente se compone de un sensor, en este caso el sitio de unión del etileno, y un regulador de la respuesta. Este receptor de dos componentes fue caracterizado en principio en bacterias, pero hoy también se conoce en plantas. El primero de los dos componentes en ser descubierto en plantas fue ETR1 (ethylene resistant 1) en *Arabidopsis Thaliana* L. Se piensa que la transducción de la señal de etileno se realiza a través de una serie de fosforilaciones llevadas a cabo por una cascada de quinasas proteicas similar a la vía de la quinasa MAP (mitogen activated protein kinase) y probablemente a través de otra, menos definida hasta el momento (Bleecker y Kende, 2000). Finalmente, un factor de transcripción presente en la célula es activado permitiendo la inducción de uno o más genes tempranos. Uno de esos genes es un auto-activador transcripcional que induce los genes tardíos. Estos últimos genes podrían codificar para enzimas que degradan la laminilla media o la pared celular durante la maduración y senescencia del fruto. También, podrían codificar para proteínas involucradas en la defensa contra patógenos, ó para proteínas requeridas para otras respuestas a etileno (Bleecker y Kende, 2000).

El etileno actúa como un regulador negativo de la vía de señalización. Esto significa, que la vía de señal es activada en ausencia de etileno y es bloqueada cuando el etileno está presente. El bloqueo de la vía induce una respuesta de etileno (Bleecker y Kende, 2000).

#### II - 1.4. Inhibición en la producción de etileno.

La inhibición en la producción de etileno debida a condiciones de anaerobiosis o de baja concentración de oxígeno fue detectada ya hace mucho tiempo. Finalmente se conoce que el paso que es afectado por esta condición es la conversión de ACC en etileno.

La temperatura es otro factor ambiental que influye mucho. En general, cuando la temperatura excede los 30°C la velocidad de producción de etileno desciende enormemente para cesar cuando la temperatura alcanza valores de 40°C. Esta inhibición es aparentemente reversible. Yu y col (1980) determinaron que la reacción afectada es la de ACC-etileno.

Anteriormente se vio que el paso determinante de la producción de etileno era SAM-ACC, y la enzima involucrada ACC sintasa. Ya se había mencionado que el AVG era un potente inhibidor (Lieberman, 1979). También debe destacarse al Acido naftilacético (NAA), entre otros. Cabe aclarar que el bloqueo en la formación de ACC, depende enormemente de la cantidad de ACC ya formado y de la velocidad con que es consumido para formar etileno. Puede predecirse que tejidos con grandes cantidades de ACC y/o una baja velocidad de producción de etileno son prácticamente insensibles a la inhibición por AVG.

La enzima ACCo, involucrada en la conversión ACC-etileno está asociada a membrana, por lo que factores tales como altas temperaturas, shock osmótico y shock a bajas temperaturas causan disrupción en la integridad de la membrana y por ende bloquean o disminuyen la producción de etileno.



Sustancias tales como NBD (2,5-norbornadieno) y  $Ag^+$  inhiben la respuesta de etileno porque se unen y bloquean al receptor de etileno. El NBD es más efectivo que los iones de plata.

## II - 1.5. Variación del contenido de ACC y producción de etileno en la maduración

El etileno promueve la maduración y caída de los frutos. Desde 1934 se sabe que las plantas por sí solas producen etileno. Varios frutos climatéricos como manzana, banana y tomate muestran un fuerte incremento de los niveles de etileno en el estadio verde tardío. Como consecuencia del alto nivel de etileno, las clorofilas se degradan y otros pigmentos son producidos. El resultado es el color típico de la piel de un fruto maduro. La actividad de varias enzimas relacionadas con la maduración se incrementa. Las pectinas, componente principal de la laminilla media, son degradadas. El fruto se ablanda. Estas actividades metabólicas están acompañadas de una mayor velocidad de respiración y en consecuencia de un alto consumo de oxígeno. Los niveles de etileno son especialmente altos en la separación de tejidos resultantes en la caída de los frutos.

Durante la maduración la síntesis del etileno es autocatalizada. El auto incremento de la síntesis y difusión de la hormona gaseosa a través del fruto contribuye a sincronizar los procesos y acelera la maduración. Probablemente cada tejido produce etileno en ciertos puntos durante el desarrollo y responde a ello de la forma apropiada (Bleecker y Kende, 2000). El transporte no es usualmente un problema porque el etileno puede difundir libremente a través de las membranas. La distribución del gas dentro de la planta ocurre a través de los espacios intercelulares.

Como se mencionó en el capítulo I, los frutos y hortalizas de tipo climatérico presentan una alta producción de etileno en los comienzos de la maduración, aunque en el estadio preclimatérico no se produce etileno debido a la inhabilidad de generar ACC (Hoffman y Yang, 1980). La enzima ACC sintasa está ausente en este período, por lo que si se administrara ACC se vería un aumento en la producción de etileno. En frutos pre-

climatéricos la reacción Met-SAM ocurre, mientras que SAM-ACC y ACC-etileno se dan en muy bajo nivel.

## **II - 1.6. Regulación en la producción de etileno inducida por estrés**

Varios tipos de estrés sufridos por el tejido de frutos y hortalizas resultan en un incremento de la producción de etileno y por ende un aumento en la respiración. Se cree que el etileno producido en respuesta al estrés es un mecanismo tipo "señal" por el cual las plantas, frutos y hortalizas activan los mecanismos de defensa. Dicho incremento puede ser causado por: químicos, extremos en temperatura, sequía, inundación, radiación, daño por insectos, daño mecánico, etc.

En experiencias con tomates verde-maduro (Yu y Yang, 1980) y a los cuales se les efectuaron cortes, se percibió un marcado incremento en la producción de ACC y etileno. Posteriores infiltraciones con cicloheximida -inhibidor de la síntesis de proteínas- produjeron un bloqueo total de la actividad de la ACC sintasa, producción de ACC y de etileno. Esto indicó que los daños por corte inducían la producción de ACC y el consecuente aumento en etileno. En frutos no-climatéricos también se ve este efecto, pero la presencia de altas cantidades de etileno no es capaz de estimular una producción autocatalítica del mismo.

La exposición a bajas temperaturas estimula la actividad de las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa (Jobling y col., 1991). Lelievre y col. (1997) hallaron, en pera, que la expresión de genes pertenecientes a ACC sintasa era regulada por el etileno sólo durante o luego del tratamiento a baja temperatura, mientras que la expresión de genes de ACC oxidasa podía ser inducida en forma separada tanto por el etileno como por las bajas temperaturas. Jobling y McGlasson (1995) hallaron que la producción de etileno se mantenía en bajos valores en manzanas Fuji almacenadas a 20°C. Por otro lado, los mismos frutos almacenados 32 días a 0°C mostraban una acumulación de ACC y un incremento de la actividad de la enzima ACC oxidasa, y finalmente el pasaje a 20°C de los mismos provocaba un gran incremento de la producción de etileno.

## II - 1.7. Usos del etileno y efectos no deseados

En cuanto a su aplicación en agricultura, el etefón (un producto químico liberador de etileno) es el regulador de crecimiento, fuera de los herbicidas, de mayor aplicación medido en términos de ingresos de las compañías de agroquímicos; esto se fundamenta en el amplio espectro de aplicaciones estudiadas y comprobadas del etileno. En este contexto la maduración de frutos, es sin duda, el uso más importante que se le da al etileno como herramienta tecnológica en poscosecha.

## II - 2. TÉCNICAS Y MANEJO DEL ETILENO EN POSCOSECHA

### II - 2.1. Efectos nocivos del etileno en poscosecha

Las cuantiosas pérdidas producidas por la acumulación del etileno en las cámaras de conservación de frutas, hortalizas y flores, han estimulado a grupos de investigación de diferentes países a desarrollar tecnología para superar este problema. La evaluación del método apropiado va a depender del producto y las técnicas de manejo utilizadas en su comercialización. Entre las estrategias más comunes podemos citar: evitar fuentes externas de etileno, adecuada recolección y manejo de los frutos, adecuado manejo de la temperatura, atmósferas modificadas, oxidantes.

### II - 2.2. Efectos benéficos del etileno en poscosecha

El etileno utilizado adecuadamente puede ayudarnos en la poscosecha para adelantar y homogeneizar la maduración de los frutos climatéricos y no climatéricos.

En el primer caso resulta un eslabón clave en la cadena de comercialización de bananas, las cuales son cosechadas verdes y transportadas por barco en atmósferas controladas y luego maduras en el lugar de destino en maduraderos donde se les dan

condiciones especiales de temperatura, humedad y concentración de etileno y dióxido de carbono.

En el segundo caso se encuentra bastante generalizado el procedimiento de desverdizado en cítricos. Algunos frutos cítricos, dependiendo de la especie, variedad, sistema de cultivo y condiciones climáticas (en general asociado con noches cálidas) pueden alcanzar la madurez y aún mantener la cáscara verde.

## II - OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo fue analizar la variación del contenido de etileno en berenjenas Money Maker N°2 en respuesta al estrés causado por el almacenamiento a bajas temperaturas. También se analizará el comportamiento de ACC, MACC y de la enzima ACCo.

## II - MATERIALES Y METODOS

### II - 1. Material vegetal y almacenamiento

Las experiencias se llevaron a cabo empleando berenjenas cuya variedad, estado de madurez y procedencia son similares a las descritas en Materiales y Métodos del Capítulo I, sección I-1 (I-MyM: I-1).

Las berenjenas se distribuyeron al azar en grupos de 6 frutos. Cada grupo se empacó en bolsas de LDPE perforadas (como se indicó en I-MyM: I-1) y luego se almacenaron en cámaras de 0 y 10°C por 13 días. Las determinaciones fueron efectuadas al inicio y luego de 1, 2, 6, 9 y 13 días de almacenamiento. También se analizaron muestras a tiempos cortos (5 y 10 h) de exposición a ambas temperaturas.

Una vez que los frutos fueron retirados de las cámaras, al día de muestreo correspondiente, se les evaluó el avance del daño por frío mediante el valor de índice de daño; se efectuaron las medidas de pérdida de electrolitos, etileno interno o producido, actividad *in-vivo* de ACCo. Luego se tomó la sección ecuatorial de cada fruto, se peló, fraccionó en pequeñas porciones, se congeló en nitrógeno líquido y finalmente se almacenó a -20°C hasta su posterior empleo en la determinación de los contenidos de ACC y MACC. El tejido perteneciente a cada fruto se almacenó en forma separada.

### II - 2. Observaciones sensoriales

Se examinaron las berenjenas pertenecientes a cada temperatura y tiempo de muestreo y se efectuó una clasificación de dichas observaciones según los índices de daño, los cuales fueron calculados de acuerdo a lo descrito en I-MyM: I-2.

### II - 3. Pérdida de electrolitos por parte del tejido

La preparación de las muestras y la determinación de la pérdida de electrolitos se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en I-MyM: I-6.

### II - 4. Determinación del contenido de etileno

*II-4.1. Obtención de la muestra gaseosa.* Se realizaron dos técnicas a fin de extraer la muestra:

- *Técnica I:* cada berenjena se sumergió en agua para poder extraer el gas contenido en el interior de ella mediante una jeringa para gases. Luego, se inyectó en el cromatógrafo gaseoso un volumen de 1 ml.
- *Técnica II:* a cada berenjena, se le quitó el cáliz, se perforó con un sacabocado en la cicatriz peduncular, dado que a través de ésta se efectúa el mayor intercambio gaseoso (Díaz-Pérez, 1997). Se introdujo un tubo de vidrio de 0,5 mm de diámetro, en cuyo extremo expuesto al ambiente poseía un séptum sellado (por donde posteriormente se tomó la muestra). Se selló el tubo a la berenjena con parafina de bajo punto de ebullición. Posteriormente se dejó el fruto 2 h a 20°C y se extrajo 1 ml de la fase gaseosa, contenida en el tubo, para ser inyectada en el cromatógrafo gaseoso.

Los resultados se expresaron en ( $\mu\text{l.Kg}^{-1}$ ).

### *II-4.2. Cuantificación por CG*

En todos los casos se cuantificó etileno por cromatografía gaseosa (CG). Se empleó un cromatógrafo gaseoso -Varian Star 3400, CX Series, USA-, empleando una columna Porapack N a 100°C conectada a un detector de ionización de llama (FID). Como gas portador se empleó Helio a un caudal de 30 ml.min<sup>-1</sup> y el tiempo de corrida se estableció en 3 min.

## II - 5. Contenido de ACC

### *II-5.1. Extracción*

Se tomaron 10 g de tejido congelado en nitrógeno líquido perteneciente a la zona ecuatorial del fruto, se lo trituró en un molinillo (Analysenmuhle A10, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik) y se extrajo con etanol 96% (3:1 v/p) a ebullición por 15 min. Se centrifugó 20 min a  $15000 \times g$  y  $4^{\circ}C$  en una Sorvall RC 5B Plus. Se filtró por Büchner y se evaporó el solvente utilizando un rotavapor -Heidolph W-Mikro- en baño de agua a  $40^{\circ}C$ . El residuo obtenido se resuspendió en 2-3 ml de agua destilada. Las extracciones se efectuaron por duplicado y empleando tejido proveniente de 4 frutos.

### *II-5.2. Determinación*

Se determinó ACC libre por oxidación química a etileno según el método propuesto por Lizada y Yang (1979) con algunas modificaciones. Se llevó a cabo la reacción en viales herméticos de 10,65 ml conteniendo la totalidad del extracto de cada muestra,  $HgCl_2$  ( $1 \mu mol$  : 5 g de tejido en peso húmedo),  $NaClO(5\%)$ - $NaOH$  saturado (2:1 v/v) en proporción  $100 \mu l.g^{-1}$  de tejido en peso húmedo y agua destilada hasta completar 6 ml finales. Luego de 5 min en agitación se tomó una muestra de 1 ml de la fase gaseosa (headspace) y se dosó etileno por CG como se indicó en la sección II-4.2. Durante toda la determinación se trabajó con baño de hielo. Los resultados se expresaron como ( $\mu moles$  de etileno .  $kg$  de tejido $^{-1}$ ).

## II - 6. Contenido de MACC

### *II-6.1. Extracción*

La extracción de MACC se efectuó de la misma manera que para ACC (sección II-5.1). Se realizaron extracciones por duplicado y empleando en cada una tejido proveniente de 4 frutos.

#### II-6.2. Determinación

La determinación de MACC se efectuó hidrolizando químicamente dicho compuesto a ACC con el método de Hoffman y col. (1982). Para tal fin se adicionó a cada extracto 100  $\mu$ l de HCl 2N : 10 g tejido, se dejó reaccionar por 2 h a 100°C, se neutralizó con NaOH 1N. Finalmente se determinó ACC total por el método de Lizada y Yang (1979) como se describió previamente (sección II-5.2).

El contenido de MACC se calculó como la diferencia en el contenido de ACC de los extractos luego y antes de la hidrólisis (MACC = ACC total - ACC libre). Los resultados se expresaron como etileno producido por el tejido en peso húmedo ( $\mu$ mol.kg<sup>-1</sup>).

#### II - 7. Actividad *in-vivo* de ACCo

La capacidad de convertir ACC en etileno se determinó *in-vivo* midiendo el etileno producido por la pulpa del tejido con agregados de ACC exógeno.

Se extrajo con sacabocado un cilindro de la zona ecuatorial del fruto. Se cortaron discos de tejido de 10  $\times$  3 mm pertenecientes al endocarpio y mesocarpio. Los discos (0,5 g), provenientes de 4 frutos, se colocaron en viales de 10,65 ml conteniendo un medio (10:1 v/p) compuesto por ACC 5 mM, manitol 0,4 M en buffer fosfato 50 mM, pH 6. Los viales fueron sellados e incubados 3 h a 30°C con agitación mecánica. Se tomó 1 ml de la fase gaseosa superior de cada vial (headspace) y se dosó el etileno generado por CG bajo condiciones experimentales descritas en sección II-4.2. Se efectuaron 2 replicados de cada muestra. La actividad de ACCo se expresó como la velocidad de producción de etileno por peso de tejido ( $\mu$ l.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).



## II - RESULTADOS

### II-1. Evolución del daño por frío

Los frutos almacenados a 10°C no exhibieron daño por frío, mientras que aquellos almacenados a 0°C exhibieron notables síntomas de la evolución del daño por frío. Estas observaciones fueron similares a las mencionadas en I-R: I-2.

### II-2. Cambios en la pérdida de electrolitos

Se emplearon los resultados obtenidos de porcentaje de pérdida de electrolitos de la pulpa de berenjenas como criterio de daño celular. Los valores hallados para la zona centro presentaron un comportamiento similar al mostrado en I-R: I-5.

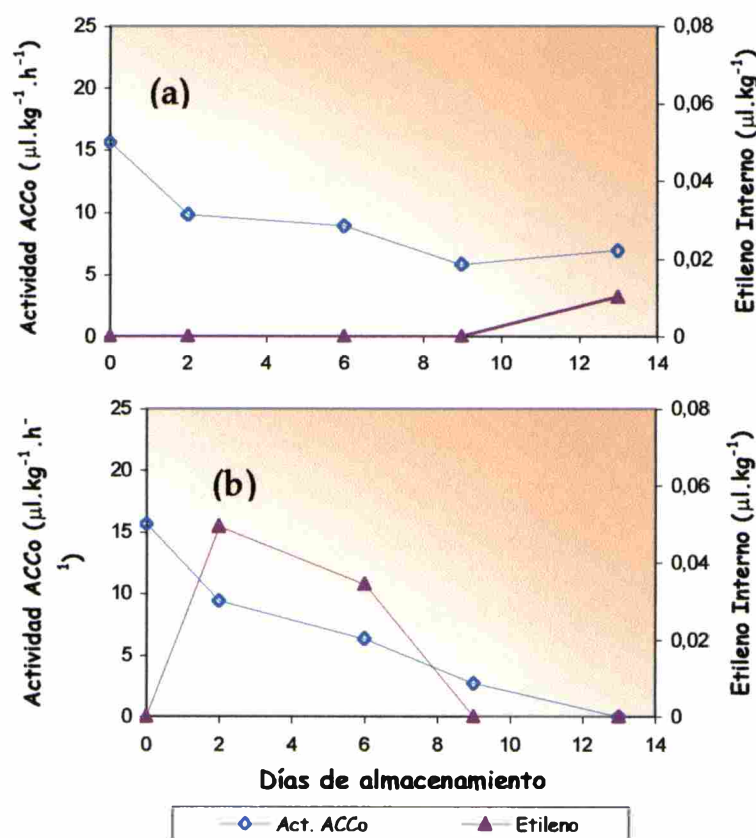
### II-3. Contenido de etileno interno durante el almacenamiento

Cuando se empleó la técnica I para la determinación del contenido de etileno interno se obtuvieron valores muy variables, por lo que la misma se dejó de utilizar. Los valores obtenidos mediante la técnica II fueron más reproducibles, por lo tanto esta técnica fue la empleada en los resultados expuestos a continuación.

A efectos de observar si el etileno presentaba una respuesta rápida a las bajas temperaturas, se analizó el contenido de etileno interno tanto a cortos períodos de almacenamiento (5, 10 y 24 h - Tabla II-1) como a lo largo de los 13 días de almacenamiento a 0 y 10°C (figura II-4 a y b). A tiempo inicial, el contenido de etileno interno del fruto no pudo ser detectado (Tabla II-1).

**Tabla II-1:** Efecto de tiempos cortos de almacenamiento a 0 y 10°C sobre el contenido de etileno interno, actividad *in-vivo* de ACCo, contenido de ACC y MACC.

	Etileno interno		Actividad ACCo		ACC		MACC	
	( $\mu\text{l.kg}^{-1}$ )	(%)	( $\mu\text{l.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	(%)	( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	(%)	( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	(%)
Inicial	ND	-	15,64	100	0,16	100	0,49	100
<i>Horas a 10°C</i>								
5	ND	-	12,13	76	0,18	114	0,40	82
10	ND	-	10,6	68	0,20	126	0,32	66
24	ND	-	12,84	82	0,21	129	0,33	67
<i>Horas a 0°C</i>								
5	ND	-	12,79	82	0,22	137	0,33	66
10	ND	-	9,55	61	0,20	126	0,32	65
24	0,04	-	10,82	69	0,49	306	0,36	74
LSD <sub>0,05</sub> = 0,02		LSD <sub>0,05</sub> = 1,2		LSD <sub>0,05</sub> = 0,12		LSD <sub>0,05</sub> = 0,26		



**Figura II-4:** Cambios de la actividad *in-vivo* de ACCo y del contenido de etileno interno durante el almacenamiento de berenjenas a 10°C (a) y 0°C (b). LSD<sub>0,05</sub> (ACCo) = 1,2 LSD<sub>0,05</sub> (Etileno) = 0,02.

Luego de 24 h (Tabla II-1) de almacenamiento a 10°C no se observó contenido de etileno interno. A lo largo del almacenamiento a esta temperatura (figura II-4a), los niveles de etileno se mantuvieron bajos, como era de esperar para un fruto no-climatérico como la berenjena.

Ante la exposición a 0°C, el contenido de etileno interno no fue detectable luego de las primeras 10 h de almacenamiento (Tabla II-1), aunque luego de 24 h se halló un valor de 0,04  $\mu\text{l.kg}^{-1}$ . Este nivel de etileno se mantuvo relativamente estable ( $p>0,05$ ) hasta el día 6 (figura II-4b) y luego retornó a valores no detectables al día 9.

#### II-4. Actividad *in-vivo* de ACCo

La actividad *in-vivo* de ACCo de berenjenas se determinó luego de que las muestras permanecieran incubadas a 30°C por 3 h, dado que a este tiempo se hallaron los mejores valores de producción de etileno.

Se analizó la actividad *in-vivo* de ACCo de berenjenas durante el almacenamiento a 0 y 10°C, tanto a tiempos cortos (5, 10 y 24 h, Tabla II-1) como luego de 13 días (figura II-4). La actividad ACCo inicial fue de 15,64  $\mu\text{l.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

La actividad de ACCo en frutos almacenados a 10°C mostró una disminución brusca luego de 5 h de exposición donde el valor hallado fue un 24% menor ( $p<0,05$ ) que el inicial (Tabla II-1). Posteriormente la disminución continuó paulatinamente pero con menor intensidad, dado que luego de 13 días de almacenamiento, el valor observado fue un 60% menor que el inicial (figura II-4a).

La actividad enzimática también disminuyó frente al almacenamiento a 0°C, pero en esta oportunidad alcanzó un valor 18% menor ( $p<0,05$ ) luego de 5 h y 30% ( $p<0,05$ ) luego de 24 h de almacenamiento a 0°C (Tabla II-1). Luego, la disminución progresó hasta valores no detectables al final del almacenamiento (figura II-4b).

## II-5. Contenido de ACC

El ACC, inmediato precursor del etileno en la ruta de biosíntesis, mostró un valor de  $0,16 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  al inicio del almacenamiento de berenjenas Money Maker N°2.

En frutos almacenados a  $10^{\circ}\text{C}$ , el contenido de ACC se mantuvo en niveles comparables ( $p>0,05$ ) al inicial hasta las 24 h de exposición a esta temperatura (Tabla II-1). Al cabo de 2 días el contenido de ACC disminuyó ( $p<0,05$ ) notablemente alcanzando un valor cercano al 10% respecto del inicial. Posteriormente se mantuvo prácticamente constante durante el resto del almacenamiento (figura II-5a).

Durante el almacenamiento a  $0^{\circ}\text{C}$  se observaron niveles similares al inicial en las primeras 5 y 10 h (Tabla II-1), y luego de 24 h hubo un incremento ( $p<0,05$ ) que alcanzó un nivel 3 veces superior al valor inicial (Tabla II-1). El contenido de ACC continuó aumentando hasta alcanzar al día 2 un valor 9 veces mayor ( $p<0,05$ ) al inicial (figura II-5b), se mantuvo prácticamente invariable hasta el día 6 y posteriormente disminuyó alcanzando un nivel 4 veces el inicial al día 9 y 6 veces el inicial al día 13.

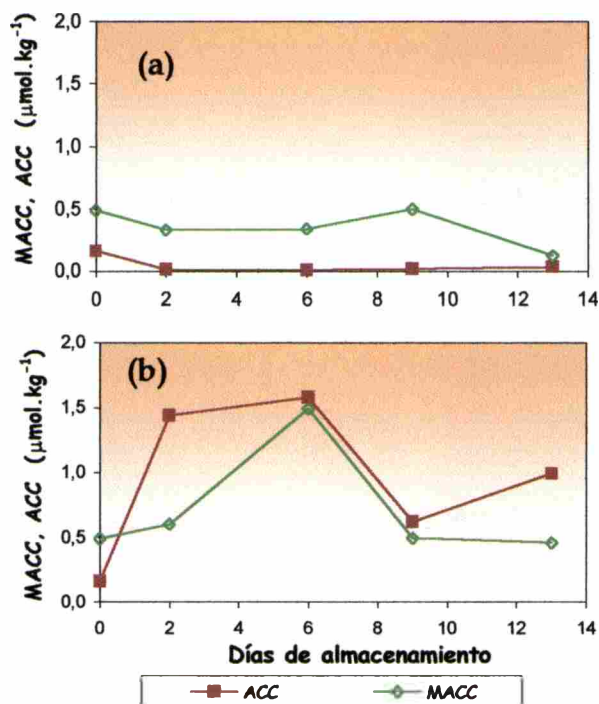


Figura II-5: Cambios en el contenido de MACC y ACC durante el almacenamiento de berenjenas a  $10^{\circ}\text{C}$  (a) y  $0^{\circ}\text{C}$  (b)  
 $\text{LSD}_{0,05}(\text{ACC})= 0,12$        $\text{LSD}_{0,05}(\text{MACC})= 0,26$

## II-6. Contenido de MACC

El MACC, forma conjugada e inactiva del ACC, mostró un valor de  $0,49 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  al inicio del almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas (Tabla II-1). Este valor es 3 veces mayor al contenido inicial de ACC.

Frente al almacenamiento a  $10^{\circ}\text{C}$  el contenido de MACC no se vio prácticamente afectado (figura II-6a,  $p>0,05$ ), aún en las primera horas de almacenamiento (5, 10 y 24 h - Tabla II-1).

Por otro lado a  $0^{\circ}\text{C}$ , las primeras 24 h de almacenamiento no provocaron variación significativa del contenido de MACC (Tabla II-1,  $p>0,05$ ). Posteriormente fue incrementando su valor hasta que al día 6 el máximo alcanzado fue 3 veces superior al inicial ( $p<0,05$ ) y comparable al valor de ACC logrado también a este tiempo y temperatura de almacenamiento (figura II-5b). Luego de 9 y 13 días, el valor de MACC disminuyó hasta niveles comparables al inicial.

Cabe destacarse que el nivel de MACC fue superior respecto del valor de ACC al inicio del almacenamiento y durante la exposición de los frutos a  $10^{\circ}\text{C}$ . En cambio, a  $0^{\circ}\text{C}$  los niveles fueron menores o similares a los de ACC.

## II - DISCUSION

Como ya se discutió en el capítulo I 10°C no causó daño por frío, en tanto que el almacenamiento de los frutos a 0°C provocó un incremento tanto en los valores de ID como en la pérdida de electrolitos, denotando una avance importante del daño por frío.

Al analizar los contenidos de etileno interno, ACC y MACC se aprecia que durante el almacenamiento de los frutos a 10°C no hubo una alteración importante de sus valores, respecto del nivel inicial encontrado para cada uno de ellos. La actividad *in-vivo* de ACCo, sin embargo, mostró una disminución paulatina a lo largo de este almacenamiento.

La exposición a 0°C fue un factor de estrés para el fruto. La respuesta a dicho estrés no se registró en las primeras 10 h. Los contenidos de etileno interno y ACC comenzaron a aumentar luego de 24 h, mientras que el contenido de MACC lo hizo luego de 2 días. Quizás haya sido necesaria una acumulación de ACC apropiada para estimular las vías biosintéticas respectivas de estos metabolitos. Los mayores contenidos de etileno, ACC y MACC se registraron hasta que los síntomas de daño por frío en los frutos comenzaron a ser notorios. El estímulo en la biosíntesis de etileno por bajas temperaturas ha sido informado también en frutos no-climáticos como pepinos (Wang y Adams, 1982), pimientos (Lin y col., 1993; Serrano y col., 1997), y en frutos climáticos como manzanas (Jobling y McGlasson, 1995) y peras (Gerasopoulos y Richardson, 1997).

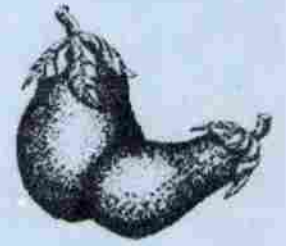
Debe mencionarse que la actividad *in-vivo* de ACCo registró un continuo descenso en frutos almacenados a 0°C, siendo dicha actividad muy baja al día 9, tiempo al cual el contenido de etileno disminuyó abruptamente a valores no detectables. Autores como Porter y col., (1986) y Yang y Hoffman (1984) han descrito a ACCo como una enzima que depende de la integridad y propiedades de la membrana. Por lo que, si se considera que a este tiempo la pérdida de electrolitos registrada fue importante, puede pensarse que la integridad de las membranas estaría seriamente comprometida y por tanto afectando la actividad de esta enzima. Un comportamiento enzimático similar fue informado en

pimientos (Lin y col., 1993) y plantines de *Vigna radiata* (Corbineau y col., 1997). Lederman y col. (1997) observaron una incapacidad para convertir ACC a etileno en mangos dañados por frío. Sin embargo, Lelievre y col. (1995) hallaron que la actividad de ACCo era inducida en manzanas pre-climatéricas dañadas por frío.

## II - CONCLUSIONES

- Frente al almacenamiento a 10°C no se observaron variaciones apreciables en los contenidos de etileno interno, ACC y MACC. Sin embargo hubo una pequeña disminución en la actividad de ACCo.
- A 0°C, el contenido de ACC se incrementó luego de las 5 h de almacenamiento, mientras que el contenido de etileno interno lo hizo a las 24 h y el de MACC a los 2 días.
- Los niveles de etileno, ACC y MACC fueron altos frente al almacenamiento a 0°C respecto del valor inicial, hasta que se observó un avance pronunciado de los síntomas de daño por frío evidenciado por la gran pérdida de electrolitos y los altos valores de ID.
- La actividad *in-vivo* de ACCo registró un continuo descenso a lo largo del almacenamiento a 0°C.





## ***Capítulo III***

# ***Variación del contenido de antocianinas y el color en berenjenas durante el almacenamiento***

### III – INTRODUCCION

#### III - I. CAMBIOS DE COLOR EN FRUTOS Y VEGETALES

El cambio de color de todo fruto o vegetal es uno de los procesos de maduración más familiares y apreciables a simple vista. No sólo es el cambio superficial de color el que ocurre, sino también en el interior del fruto o vegetal se verifican grandes cambios.

Los tipos de pigmentos, se resumen en:

- ◆ **Clorofilas:** Todos los frutos y hortalizas poseen este pigmento. La degradación de clorofilas está acompañada por la aparición de otros colores, los cuales hacen referencia a la familia de los carotenoides y antocianinas, principales pigmentos en frutos y hortalizas.
- ◆ **Carotenoides:** Los mismos están normalmente presentes en los cloroplastos como parte del sistema fotosintético, dejando de estar enmascarados y dominando el color de base ante la desaparición de las clorofilas, tal es el caso de las bananas o peras. En otros frutos y hortalizas, incluyendo el durazno, cítricos, morrones, los cromoplastos comienzan la síntesis de nuevos carotenoides (Leshem, 1986).
- ◆ **Antocianinas:** Son un grupo de sustancias fenólicas de pigmentos, de color rojo y azul principalmente, y constituyen la otra gran familia de pigmentos de los frutos y hortalizas. Estas, a diferencia de las clorofilas y los carotenoides, son solubles en agua y están fuera de los cloroplastos, compartimentalizadas en las vacuolas. Las antocianinas son el pigmento que imparte color a la piel de berenjena, por este motivo a continuación se estudiarán en detalle.

#### III – I.I. ANTOCIANINAS

##### III – 1.1.1. Orígen bioquímico

Las antocianinas constituyen uno de los tres grupos de flavonoides. Estos últimos son compuestos de 15 carbonos que se encuentran en todo el reino vegetal

(Harborne, 1988; Stafford, 1990). La estructura básica de los flavonoides (figura III-1), comúnmente se ve modificada de tal forma que se presentan aún más dobles enlaces, lo que hace que los compuestos absorban luz visible, dándoles color. Los dos anillos de carbono en los extremos izquierdo y derecho de la molécula de flavonoide se designan A y B, respectivamente.

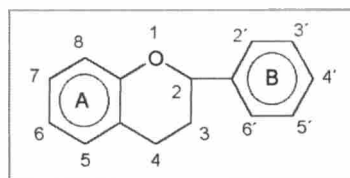


Figura III-1: Estructura química de los flavonoides

En los flavonoides casi siempre se presentan grupos hidroxilo, unidos al anillo B en las posiciones 3' y 4', y/o en las posiciones 5 y 7 del anillo A, o en la posición 3 del anillo central. Estos grupos hidroxilo sirven como puntos de unión de azúcares que incrementan la solubilidad en agua de los flavonoides. La mayoría de los flavonoides se acumulan en la vacuola central, aunque se sintetizan fuera de ésta.

Los flavonoides se dividen en tres grupos (figura III-2) de importancia en fisiología vegetal. Ellos son las antocianinas, los flavonoles y las flavonas (Salisbury y Ross, 1994).

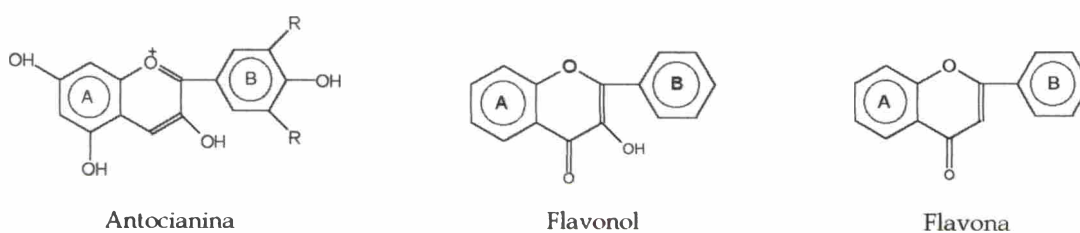


Figura III-2: Estructura química parental de antocianinas, flavonoles y flavonas.

### III - 1.1.2. Química y transformación estructural

Las antocianinas (del griego *antos*, flor, y *ciano*, azul oscuro) son pigmentos coloreados que por lo común se encuentran tanto en flor, tallo, hoja, raíces como en frutos.

La estructura base es la antocianidina (figura III-3) y las antocianinas son derivados glicosilados, por lo común con una o dos unidades de glucosa o galactosa unidas al grupo hidroxilo del anillo central, o al grupo hidroxilo localizado en la posición 5 del anillo A.

Las antocianidinas (figura III-3) suelen nombrarse conforme a la planta específica de la que se obtuvieron originalmente (Salisbury y Ross, 1994), recibiendo el nombre pelargonidina, cianidina, delfinidina. Estas antocianidinas difieren sólo en el número de grupos hidroxilo unidos al anillo B de la estructura flavonoide básica. Sakamura y col., (1965) y Matsuzoe y col., (1999) hallaron que la principal antocianina presente en berenjena es un derivado de la delfinidina. Otras antocianidinas importantes son la peonidina, petunidina y malvinidina.

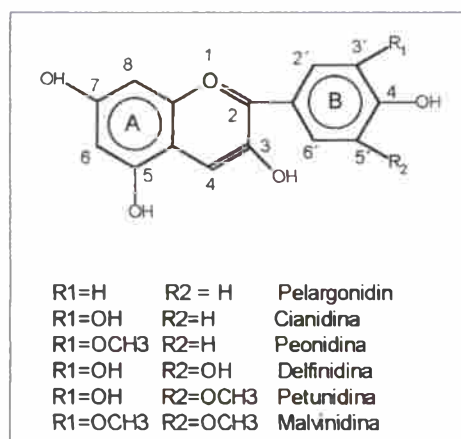


Figura III-3: Estructura parental -antocianidina- y derivados glicosilados -antocianina- (con residuos de azúcares en las posiciones 3 y 5). (Extraído de Leshem (1986) en "Processes and Control of Plant Senescence", pág.168)

Las antocianinas son sensibles al cambio de pH, tornándose rojas a valores ácidos y azules a valores alcalinos. A pH ácidos la estructura de las antocianinas puede representarse por la estructura I (figura III-4) dando una solución roja, si el pH aumenta tiende a decolorarse dando la estructura II (figura III-4). A valores más elevados de pH, cercanos o sobre el valor de neutralidad, aparece un color azulado o verdoso, cuya estructura sería la III (figura III-4).

Hay indicios de que la pseudobase II puede sufrir la ruptura del anillo central y generar la forma IV (figura III-4.). Y aún más, a valores muy altos de pH las rupturas de los anillos y/o las oxidaciones tienen lugar rápidamente llegando a la pérdida irreversible de las antocianinas (Buren, 1970).

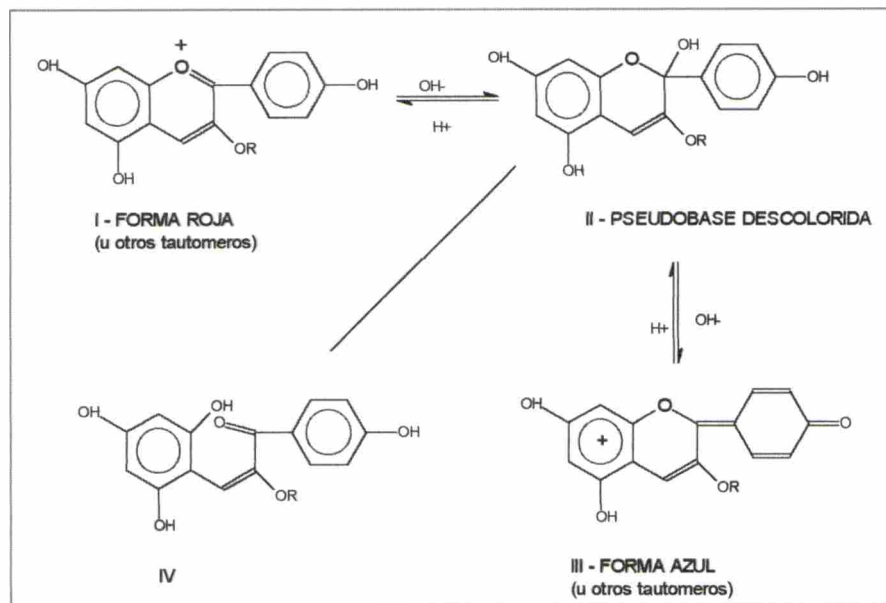


Figura III-4: Cambios en la estructura de antocianinas debidas a la variación del pH. (Extraído de Hulme (1970) en "The Biochemistry of Fruits and their Products", pág. 292)

### III - 1.1.3. Estabilización y aumento del color

En todo producto natural, las antocianinas no actúan en forma aislada sino en combinación con otros compuestos orgánicos y con metales. Aparentemente la copigmentación causa un efecto batocrómico (desplazamiento del máximo de absorbancia a mayores longitudes de onda) en el pico de la forma catiónica, pero no un incremento de la absorbancia (Timberlake, 1981). También se sabe que si las antocianinas se asocian con flavonas o flavonoles generan un efecto azulado. Por último si se asocian entre sí, en especial a concentraciones elevadas, causan un efecto de enrojecimiento o azulado, dependiendo de la antocianina y del pH de las vacuolas en donde se acumulan (Hoshino y col., 1981).

---

La formación de complejos con metales es otro factor capaz de estabilizar las bases quinónicas de antocianinas. Hierro, magnesio y aluminio serían algunos de los metales requeridos. En gran medida se estabiliza el color azul de antocianinas, no excluyendo la posibilidad de que dicho color sea también una consecuencia de la co-pigmentación, o que en ciertos casos el color rojo resulte también de la formación de complejos con metales (Timberlake, 1981).

#### III - 1.1.4. Biosíntesis

Trabajos realizados con precursores lábiles y mutantes de flores muestran que los dihidroflavonoles (flavononoles), los cuales se formarían a partir de las flavononas por medio de la oxidasas microsomales, son los verdaderos intermediarios en la biosíntesis de antocianinas (figura III-5) (Grisebach, 1979).

La fenilalanina (figura III-5), precursor de varias rutas metabólicas, sería la estructura inicial y sería la base para la formación del anillo B. Por efecto de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL) se produce la desaminación para formar el ácido cinámico. Luego, este ácido se convierte en ácido p-cumárico por adición de un átomo de oxígeno de O<sub>2</sub> y un átomo de hidrógeno de NADPH directamente a la posición *para* del ácido cinámico. Posteriormente se produce la esterificación del extremo ácido con CoA y se forma el p-cumaril-CoA. Luego, éste se uniría a tres grupos acetatos de la molécula de malonil-CoA para formar el anillo A del flavonoide. Finalmente, en presencia de OH<sup>-</sup> se formaría el flavonol y finalmente la antocianidina.

Se conoce que la formación de las antocianinas es estimulada a menudo por la luz. Se cree que la desaminación de la fenilalanina es uno de los pasos catalizados por la luz (Salisbury y Ross, 1994). La producción de estos pigmentos también es afectada por las condiciones ambientales reinantes, las bajas temperaturas favorecen la acumulación de antocianinas lo cual fue demostrado para uvas, manzanas y otros frutos (Goldschmidt, 1980). El etileno o aquellos compuestos que liberen etileno estimulan la producción de las antocianinas, al igual que en el caso de los carotenoides.

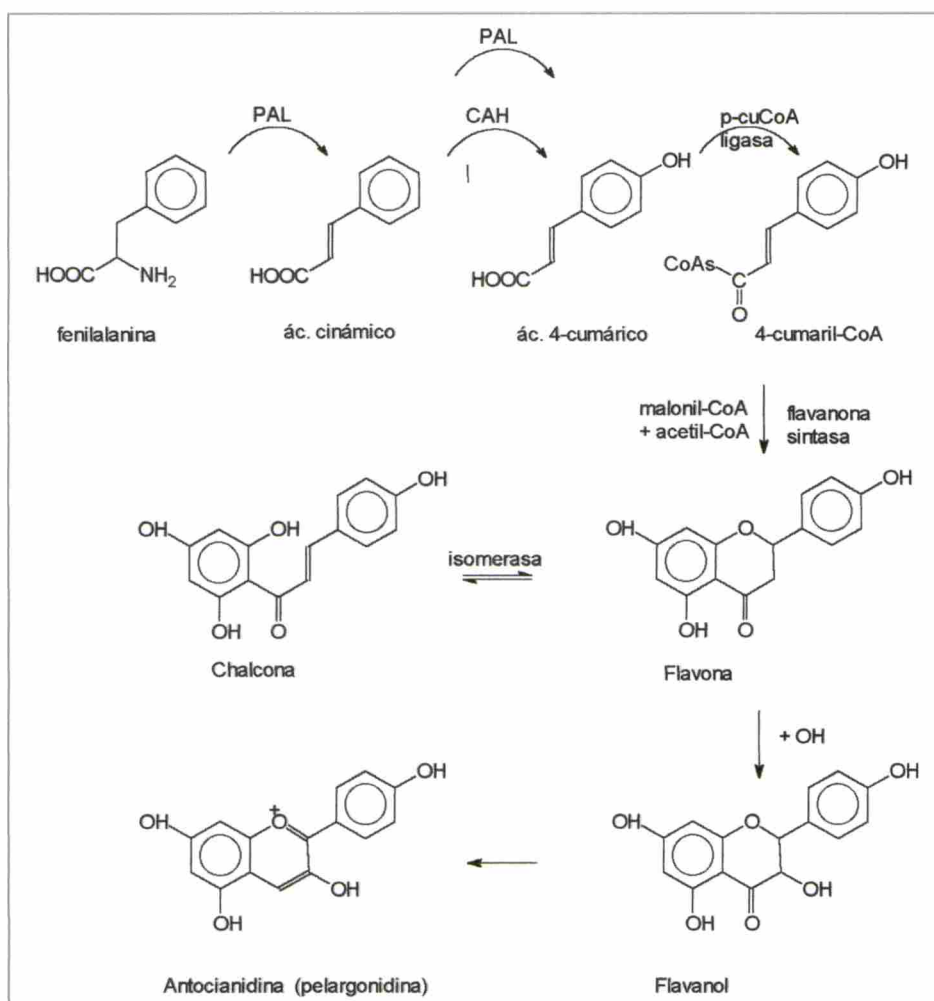


Figura III-5: Biosíntesis de antocianidinas. (Extraído de Friend y Rhodes, 1981, (eds.) de "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables". Pag. 231).

### III - 1.1.5. Actividad antioxidante

Cuando las plantas son expuestas a un estrés por baja temperatura se verifica una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete, las cuales causan peroxidación lipídica (Foyer y col, 1997). Las plantas poseen sistemas antioxidantes que protegen las células de los efectos del daño oxidativo causado por las ERO. Entre algunos de los mecanismos de defensa se hallan las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), glutatión reductasa (GR); y también compuestos tales como ácido ascórbico, glutatión, tocoferoles, entre otros. Estudios

realizados por Yamasaki, y col., (1996) han mostrado que también las antocianinas podrían ser un mecanismo de defensa, ya que las mismas pueden atrapar *in-vitro* radicales superóxido, siendo su velocidad de reacción considerablemente menor respecto de SOD, pero comparable a la de ascorbato o glutatión. Pero aún no está claro si, *in-vivo*, las antocianinas atrapan a las ERO y con que tipo de ERO puede reaccionar. La antocianina es uno de los flavonoides con mayor poder reductor, y puede ser inferido que, las mismas cumplan, probablemente, un rol importante en la reacción con las ERO y en regular el estado redox de la célula (Leng y Qi., 2003). Las antocianinas se acumulan rápidamente a bajas temperaturas (Leng y Qi., 2003; Parker, 1962; Leng y col., 1993, 1995). Leng (1998) ha informado que el contenido de antocianinas posee una correlación positiva con la tolerancia al congelado de tejido de la corteza de brotes pertenecientes a plantas de manzanos. También, Leng y Qi (2003) mostraron que el rociado de plantines con soluciones de distinta concentración de antocianina y posterior exposición a baja temperatura causó una disminución del contenido de malondialdehído (MDA) e inhibió el incremento de la pérdida de electrolitos, sugiriendo así que las antocianinas, en parte, podrían actuar como antioxidantes protegiendo a los plantines del daño por frío. También hallaron, en esa misma experiencia que el rociado con antocianina disminuyó la respuesta de SOD y fenilalanina-amonio-liasa (PAL), por lo que las antocianinas podrían contribuir a la regulación del estado redox de la célula. De cualquier manera, la función fisiológica de las antocianinas en la resistencia al frío permanece aún incierta.

#### IV - OBJETIVO

El propósito del presente capítulo fue analizar la evolución del contenido de antocianinas y los distintos parámetros de color durante el almacenamiento refrigerado de berenjenas. En especial, determinar su comportamiento en ambas zonas del fruto y a la temperatura que provoca daño por frío durante el almacenamiento.



### III - MATERIALES Y METODOS

#### III-1. Material vegetal y almacenamiento

Las experiencias se llevaron a cabo empleando berenjenas cuya variedad, estado de madurez y procedencia son similares a las descritas en Materiales y Métodos del Capítulo I, sección I-1 (I-MyM: I-1).

Las berenjenas se distribuyeron al azar en grupos de 6 frutos. Cada grupo se empacó en bolsas de LDPE perforadas (como se indicó en I-MyM: I-1) y luego se almacenaron en cámaras de 0, 5 y 10°C por 15 días. Las determinaciones fueron efectuadas al inicio y luego de 2, 6, 9, 13 y 15 días de almacenamiento.

Una vez que los frutos fueron retirados de las cámaras, al día de muestreo correspondiente, se les evaluó el avance del daño por frío mediante el valor de índice de daño y se efectuaron las medidas de color de la piel. Finalmente se peló el fruto, diferenciando la piel de la zona centro respecto de la perteneciente a zona cáliz, se las congeló en nitrógeno líquido y se las almacenó a -20°C en forma separada para luego efectuar la extracción de las antocianinas.

#### III-2. Observaciones sensoriales y cálculo del índice de daño

A cada día de muestreo, se evaluaron visualmente los síntomas de daño por frío en la pulpa y piel de las berenjenas a través de una escala subjetiva que consideraba los distintos síntomas de daño observados para este fruto, ya descrita en I-MyM: I-2.

Se calculó y asignó a cada fruto el índice de daño correspondiente, como también se describiera en dicha sección.

### III-3. Determinación del color superficial

Se empleó un colorímetro Minolta modelo CR-300 para la medición del color superficial de frutos enteros provenientes de cada temperatura y día de muestreo. Se diferenciaron las mediciones efectuadas en la zona ecuatorial o centro y en la zona debajo del cáliz o cáliz. Los parámetros analizados fueron:

L\* Luminosidad, equilibrio entre negro (0) y blanco (100)

a\* equilibrio de verde (-a) a rojo (+a)

b\* equilibrio de azul (-b) a amarillo (+b)

Cr Cromo =  $(a^2 + b^2)^{1/2}$  = grado de saturación del color

Hue Hue =  $\text{tg}^{-1}(b/a)$  = color

### III-4. Contenido de antocianinas

#### *III-4.1. Extracción*

Se extrajeron pigmentos de la piel de zona ecuatorial o centro y zona debajo del cáliz o cáliz del fruto. En ambos casos se utilizaron pequeñas secciones de piel, de 1-2 mm de espesor, almacenados a -20°C. Se sumergieron en Nitrógeno líquido para luego triturarlos en un molinillo (Analysenmuhle A10, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik). Efectuándose cada muestra por triplicado, se pesaron 0,5 g y luego se realizaron entre 3 y 5 extracciones con Metanol-ClH al 1%. Se emplearon, en cada extracción, volúmenes de 6-7 ml de extractante para zona centro y 4-5 ml para zona cáliz. Es de destacar que siempre se tuvo la precaución de que los tubos permanecieran tapados y en oscuridad durante el tiempo de contacto. Luego de cada extracción se centrifugó y separó el sobrenadante, para más tarde juntarlos y llevarlos a volumen (100 ml finales para centro y 50 ml para cáliz).

#### *III-4.2. Determinación*

El contenido de antocianinas en el extracto se determinó midiendo la absorbancia a 538 nm en espectrofotómetro -Beckman DU 650-.

Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia por gr de tejido fresco y ml de extractante (DO.  $\text{gr}^{-1}.\text{ml}^{-1}$ ).

#### *III-4.3. Determinación de la longitud de onda*

A fin de hallar el  $\lambda$  apropiado para efectuar la medida del contenido de antocianinas, se determinó la absorbancia a  $\lambda$  entre 240 y 800 nm a los extractos conteniendo las antocianinas de zona centro y cáliz por separado.

#### **III-5. Análisis estadístico**

Se empleó un diseño factorial definiendo: temperatura (3 niveles), tiempo de almacenamiento (6 niveles) y zonas del fruto (2 niveles) como factores. Los resultados fueron procesados mediante un ANOVA y las medidas comparadas por el test LSD con una significancia de 0,05 usando el software SYSTAT.

### III - RESULTADOS

#### III-1. Evolución del daño por frío

Los frutos almacenados a las distintas temperaturas de trabajo mostraron una evolución del daño por frío como se describiera en I-R: I-2. Esto significa que la temperatura de 10°C no causó daño por frío, mientras que 0° y 5°C incidieron notablemente sobre la calidad de los frutos al provocar daño por frío, en especial 0°C.

Los índices de daño calculados ya han sido mostrados en la sección mencionada recientemente y en la figura I-2.

#### III-2. Determinación del contenido de antocianinas

##### *2.1. Puesta a punto de la técnica de extracción y determinación*

En primera instancia se estableció tanto el volumen como el número de extracciones a realizar con Metanol-ClH al 1% para efectuar la extracción del total de antocianinas presentes en la piel de zona centro y zona cáliz de cada fruto. Los resultados permitieron establecer que las mejores condiciones para efectuar la extracción fueron: emplear 0,5 g de piel y extraer 5-6 veces con 6-7 ml de Metanol-ClH al 1% para el caso de zona centro, mientras que para zona cáliz se debe extraer 3-4 veces con 4-5 ml de extractante.

Por otro lado, no se conoce con exactitud las antocianinas que imparten color a esta variedad de berenjenas. Esto llevó a tener que efectuar un escaneo de longitudes de onda a cada muestra ensayada, y obtener el espectro correspondiente. Como se muestra en la figura III-6, el espectro presentó una zona con muchas perturbaciones a  $\lambda < 350\text{nm}$ , dos picos de baja intensidad a 415 y 649 nm, y una banda amplia de mayor absorbancia con centro en 538 nm. Esta última  $\lambda$  es la que se utilizó para el análisis del contenido de

antocianinas. Este tipo de espectro fue obtenido para muestras pertenecientes tanto a zona centro como cáliz.

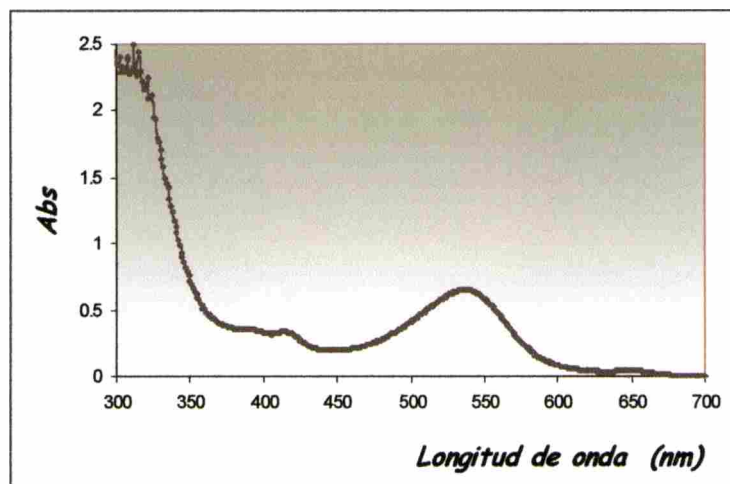


Figura III-6: Espectro UV-Visible de pigmentos totales extraídos con Metanol-ClH 1%.

### III-2.2. Color superficial de berenjenas

Las determinaciones de color en zona centro y cáliz han mostrado diferencias apreciables en los parámetros de color. En la figura III-7 se puede ver que el color púrpura-negro de la zona centro genera valores positivos de  $a^*$  (rojo) y positivos o negativos de  $b^*$  (amarillo-azul), ambos cercanos a cero. De la observación de dicho gráfico también puede deducirse que los valores de Cr son bajos (color poco saturado) y los de Hue son pequeños y ligeramente negativos o positivos. En cambio, el color púrpura-rojizo de la zona cáliz muestra valores positivos de  $a^*$  y mayores que los de zona centro; valores negativos de  $b^*$  y menores que los de zona centro; valores de Cr mayores que zona centro y valores de Hue negativos y mayores respecto de zona centro. En cuanto a los valores de  $L^*$ , la zona centro posee valores más bajos respecto de la zona cáliz, denotando así menor luminosidad en dicha zona (datos no mostrados).

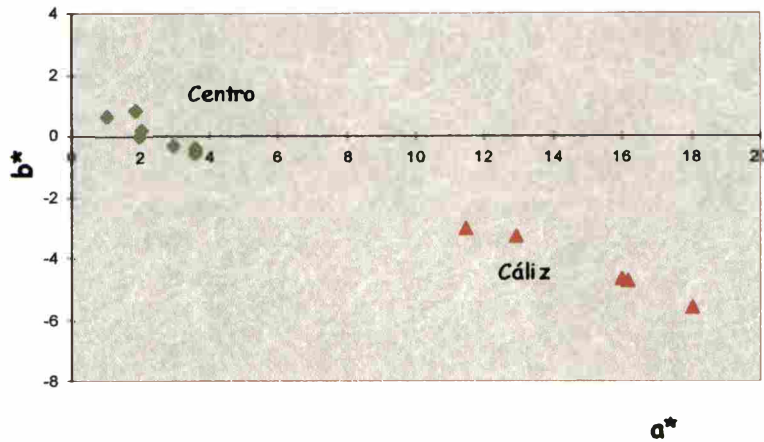


Fig. III-7: Variación de  $b^*$  respecto de  $a^*$  hallada para los distintos sectores de las berenjenas analizadas

### III-2.3. Relación entre contenido de antocianinas y parámetros de color

A efectos de poder hallar una relación entre el contenido de antocianinas y el color desarrollado por ellas, se realizaron una serie de determinaciones en las cuales se midió el color (parámetros  $L$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $Cr$  y Hue) a diversas porciones delimitadas de las zonas centro y cáliz de la piel de berenjenas y que poseían diferente grado de desarrollo de color. A las porciones con distinto color se les efectuó la extracción y posterior determinación del contenido de antocianinas. Los resultados se muestran en la figura III-8.

En ella puede verse que el contenido de antocianinas en zona centro es mayor ( $p < 0,05$ ) que el de zona cáliz. Dichos valores variaron entre  $0,021-0,183 \text{ DO.g}^{-1}.\text{ml}^{-1}$  y entre  $0,004-0,018 \text{ DO.g}^{-1}.\text{ml}^{-1}$  para zona cáliz.

Los valores de  $a^*$  (Fig. III-8a) mostraron valores positivos y menores a 4 para altos contenidos de antocianina (zona centro), donde el color observado fue púrpura-negro. Sin embargo, el parámetro  $a^*$  para bajos contenidos de antocianina (zona cáliz) presentó valores positivos y mayores a 10, correspondiendo así con el color más rojizo que se observó en esta zona de los frutos.

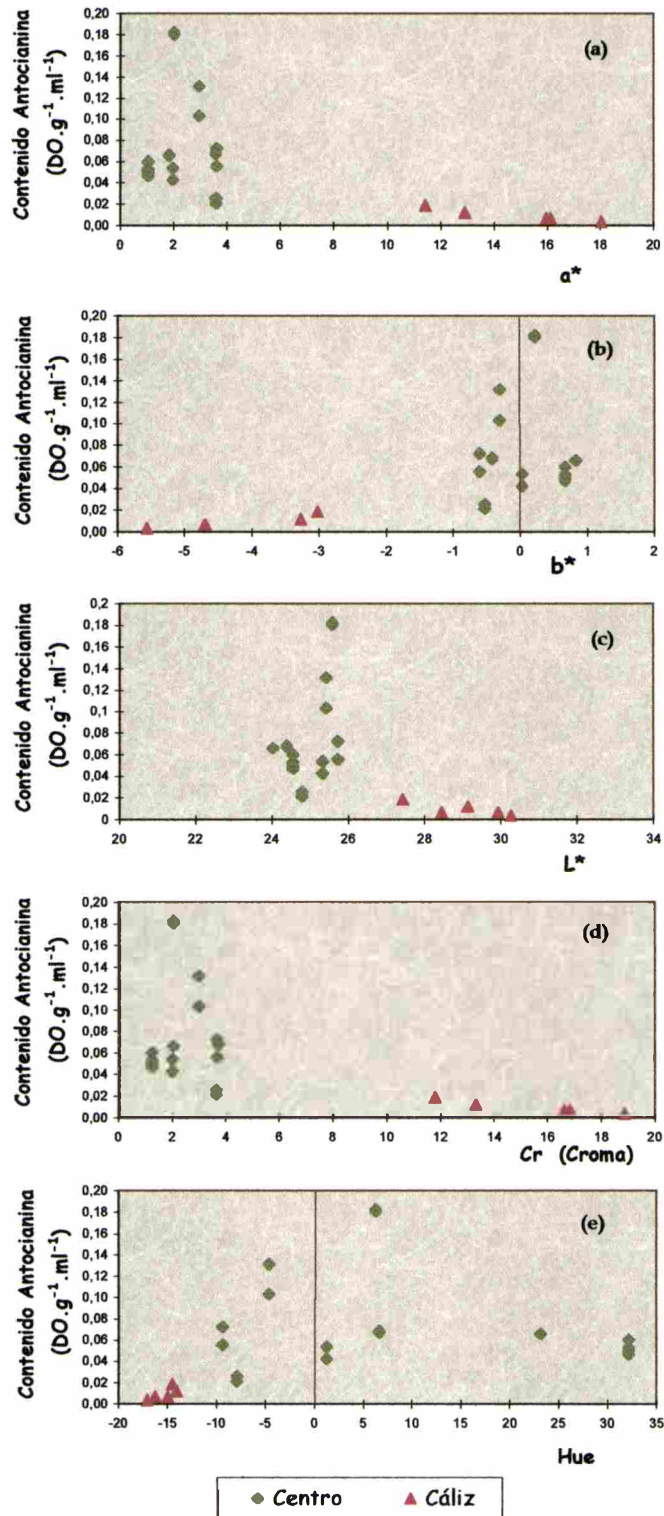
El parámetro  $b^*$  (Fig. III-8b) mostró valores muy cercanos a 0, tanto positivos como negativos, para altos contenidos de antocianina (zona centro). Mientras que valores negativos y entre -3 y -6 fueron observados para bajos contenidos de antocianina (zona cáliz), denotando así mayor predominio del azul en esta zona donde el púrpura-rojizo era el color observado visualmente.

El parámetro  $L^*$  (Fig. III-8c) se concentró entre valores de 24 y 26 para los distintos contenidos de antocianinas de la zona centro, y por otro lado mostraron valores entre 27 y 30 para la zona del cáliz. Así se comprueba que la zona cáliz poseía más luminosidad que la zona centro, debido tal vez al color más claro presente en ella.

Al analizar el  $Cr$  (fig. III-8d) se pudo ver que los mayores contenidos de antocianina (zona centro) presentaron valores de  $Cr$  entre 1 y 4, mientras que los bajos valores de antocianina (zona cáliz) mostraron valores entre 12 y 19, denotando colores más saturados que la zona centro.

El parámetro  $Hue$  (Fig. III-8e), abarcó ángulos entre  $-10^\circ$  y  $33^\circ$  para la zona centro o de mayor contenido de antocianina y mostró ángulos entre  $-20^\circ$  y  $-14^\circ$  para la zona del cáliz; indicando distintas tonalidades dentro de la zona de los rojos oscuros.

Finalmente, cabe mencionarse que las muestras de la zona centro exhibieron un amplio rango de valores de contenido de antocianinas, pero los mismos se correspondieron con un acotado rango de valores de los distintos parámetros de color, excepto en el caso de  $Hue$ . Mientras que para la zona cáliz, fue a la inversa: un acotado rango de valores de contenido de antocianinas se correspondió con un amplio rango de valores de parámetros de color, excepto en el caso de  $Hue$ .



**Figura III-8:** Relación entre el contenido de antocianinas y los parámetros de color a\* (a), b\* (b), L\* (c), Cr (d) y Hue (e) para las zonas centro y cáliz de los frutos. Para centro: LSD<sub>(a)</sub>=0,51; LSD<sub>(b)</sub>=0,25; LSD<sub>(L)</sub>=0,47; LSD<sub>(Cr)</sub>=0,44; LSD<sub>(Hue)</sub>= 1,14. Para cáliz: LSD<sub>(a)</sub>=1,22; LSD<sub>(b)</sub>=1,05; LSD<sub>(L)</sub>=0,85; LSD<sub>(Cr)</sub>=0,68; LSD<sub>(Hue)</sub>= 0,23.



### III-3. Parámetros de color durante el almacenamiento a bajas temperaturas

Los parámetros de color de zona centro, no presentaron grandes cambios a lo largo del almacenamiento a las distintas temperaturas (figuras III-9, III-10 y III-11), excepto los parámetros  $L^*$  y Hue. El valor de  $L^*$  sólo mostró alteraciones a  $0^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual se observó un ligero incremento luego de 2 días ( $p < 0,05$ ), se mantuvo prácticamente invariable ( $p < 0,05$ ) hasta el día 13 y finalmente aumentó ( $p < 0,05$ ) alcanzando un nivel comparable al inicial. El valor de Hue aumentó ( $p < 0,05$ ) en los primeros días de almacenamiento a todas las temperaturas y luego permaneció relativamente constante hasta el final del almacenamiento, excepto a  $5^{\circ}\text{C}$  donde disminuyó al día 15.

En zona cáliz, durante el almacenamiento a  $10^{\circ}\text{C}$  (figura III-9) el parámetro  $a^*$  mostró una disminución ( $p < 0,05$ ) del 20% luego de 2 días y luego permaneció prácticamente constante hasta el día 15 ( $p > 0,05$ ). Una variación similar se observó en el parámetro Cr. Mientras que, los parámetros  $b^*$ ,  $L^*$  y Hue no mostraron variaciones considerables ( $p > 0,05$ ). A  $0^{\circ}\text{C}$  (figura III-11) el parámetro  $a^*$  disminuyó ( $p < 0,05$ ) un 30% al día 2, luego comenzó a aumentar hasta lograr un máximo a los 9 días, comparable al valor inicial. También a esta temperatura, dichas variaciones fueron similares a las de Cr. La variación más notoria en  $b^*$  se registró sobre el final del almacenamiento, donde dejó de tener valores negativos para alcanzar altos valores positivos ( $p < 0,05$ ). Este aumento se correspondió con un aumento en el valor de Hue y en menor medida en  $L^*$ . A  $5^{\circ}\text{C}$  (figura III-10) las variaciones en  $a^*$  y Cr fueron menos pronunciadas que a  $0^{\circ}\text{C}$  y el valor máximo se alcanzó a los 13 días. Los parámetros  $b^*$ ,  $L^*$  y Hue no presentaron grandes variaciones a lo largo del almacenamiento.

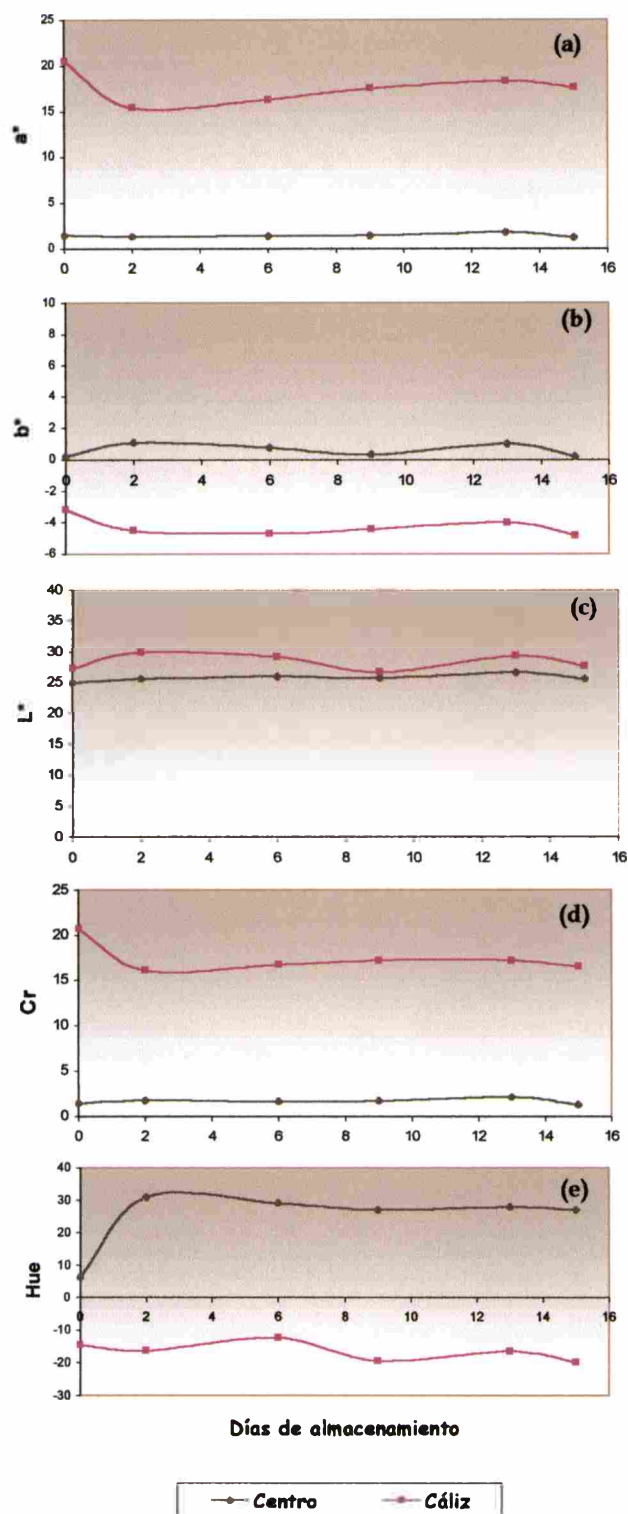


Figura III-9: Comparación de los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $Cr$  y Hue pertenecientes a zona centro y zona cáliz a  $10^\circ\text{C}$  en función de los días de tratamiento. Para centro:  $LSD_{(a \times T)}=0,63$ ;  $LSD_{(b \times T)}=0,64$ ;  $LSD_{(L \times T)}=1,41$ ;  $LSD_{(Cr \times T)}=0,61$ ;  $LSD_{(Hue \times T)}= 1,02$ . Para cáliz:  $LSD_{(a \times T)}=1,71$ ;  $LSD_{(b \times T)}=1,22$ ;  $LSD_{(L \times T)}=1,24$ ;  $LSD_{(Cr \times T)}=0,83$ ;  $LSD_{(Hue \times T)}= 2,13$ .

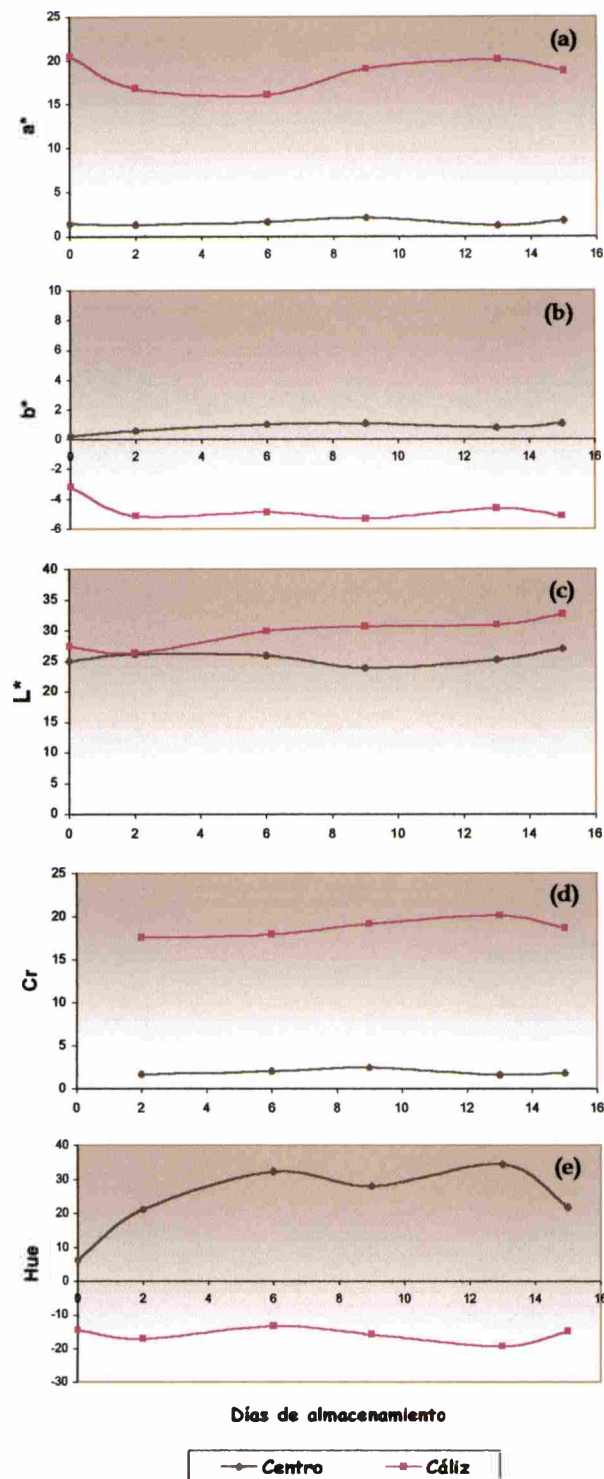


Figura III-10: Comparación de los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $Cr$  y Hue  $^*$  pertenecientes a zona centro y zona cáliz a 5°C en función de los días de tratamiento. Para centro:  $LSD_{(a \times T)}=0,63$ ;  $LSD_{(b \times T)}=0,64$ ;  $LSD_{(L \times T)}=1,41$ ;  $LSD_{(Cr \times T)}=0,61$ ;  $LSD_{(Hue \times T)}= 1,02$ . Para cáliz:  $LSD_{(a \times T)}=1,71$ ;  $LSD_{(b \times T)}=1,22$ ;  $LSD_{(L \times T)}=1,24$ ;  $LSD_{(Cr \times T)}=0,83$ ;  $LSD_{(Hue \times T)}= 2,13$ .

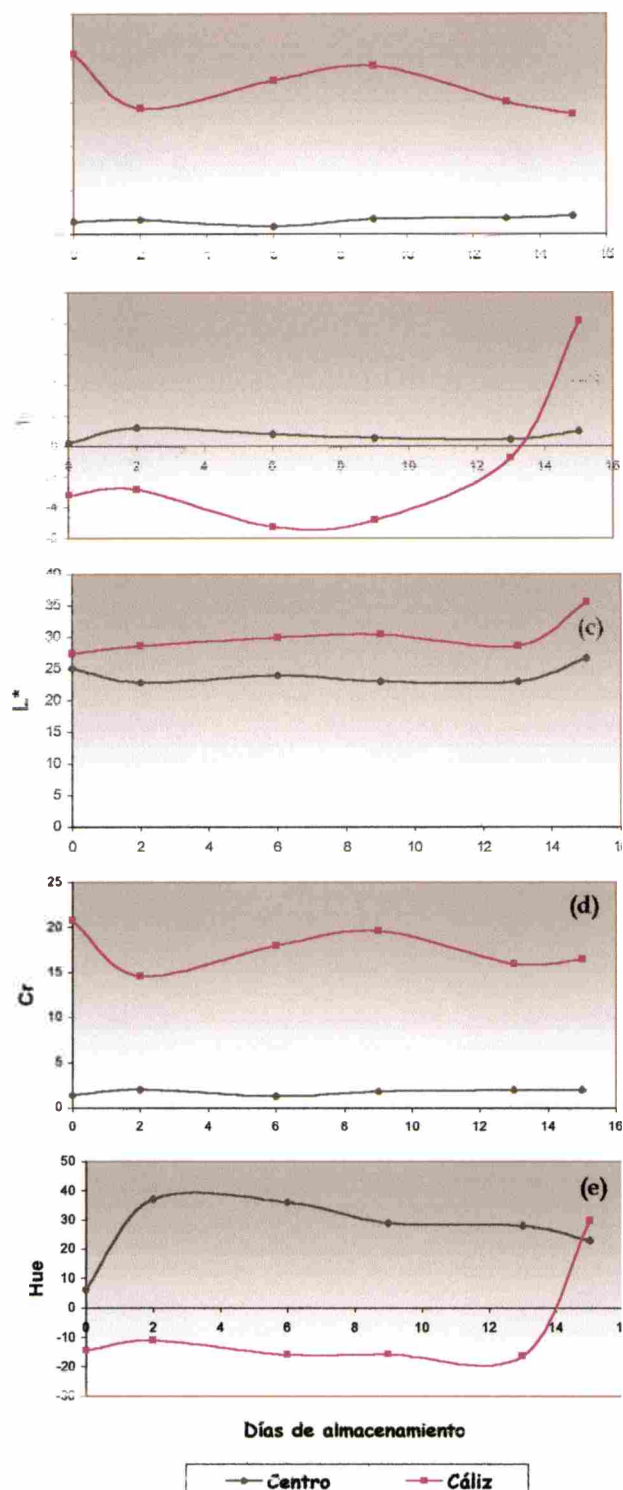


Figura III-11: Comparación de los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $Cr$  y Hue pertenecientes a zona centro y zona cáliz a  $0^{\circ}\text{C}$  en función de los días de tratamiento. Para centro:  $\text{LSD}_{(a^*,T)}=0,63$ ;  $\text{LSD}_{(b^*,T)}=0,64$ ;  $\text{LSD}_{(L^*,T)}=1,41$ ;  $\text{LSD}_{(Cr,T)}=0,61$ ;  $\text{LSD}_{(\text{Hue},T)}= 1,02$ . Para cáliz:  $\text{LSD}_{(a^*,T)}=1,71$ ;  $\text{LSD}_{(b^*,T)}=1,22$ ;  $\text{LSD}_{(L^*,T)}=1,24$ ;  $\text{LSD}_{(Cr,T)}=0,83$ ;  $\text{LSD}_{(\text{Hue},T)}= 2,13$ .

#### **III-4. Contenido de antocianinas durante el almacenamiento a bajas temperaturas**

En la figura III-12 se muestra la evolución del contenido de antocianinas a lo largo de los días de almacenamiento a todas las temperaturas ensayadas (0, 5 y 10°C). El contenido inicial de antocianinas de la zona cáliz fue 0,16 DO.g<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup> y 0,22 DO.g<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup> para la zona centro, siendo este último valor 1,4 veces mayor al hallado para el cáliz.

Luego de 6 días de almacenamiento a 10°C (fig. III-12a), se observó una disminución del 26% y 56% para la zona centro y cáliz, respectivamente (p<0,05). Posteriormente ambas zonas mostraron niveles relativamente constantes hasta el final del almacenamiento. El contenido de antocianina fue, prácticamente, 2,3 veces mayor en zona centro respecto de zona cáliz durante el almacenamiento.

A 0°C (fig. III-12c) y en la zona del centro, se percibió una disminución del 38% en el contenido de antocianinas a los 2 días de tratamiento, luego un incremento (p<0,05) hacia el día 9 (sin alcanzar el valor inicial) para posteriormente disminuir en los días 13 y 15. Una tendencia similar se registró con los datos pertenecientes a la zona cáliz, pero con la diferencia de que la disminución al día 2 fue del 73% y luego del incremento registrado hasta el día 9, el nivel de antocianina se mantuvo relativamente constante hasta el final del almacenamiento.

A 5°C (fig. III-12b) se verificó, en centro, una tendencia similar a la observada a 0°C. Se percibió una disminución del 40% al día 2 y un posterior aumento (p<0,05), pero que en esta oportunidad llegó hasta el día 13, alcanzando un valor similar al correspondiente al máximo de los 9 días a 0°C. En cáliz, se percibió una disminución del 80% del contenido de antocianinas luego de 6 días, y un posterior incremento leve hasta el día 15 (p<0,05).

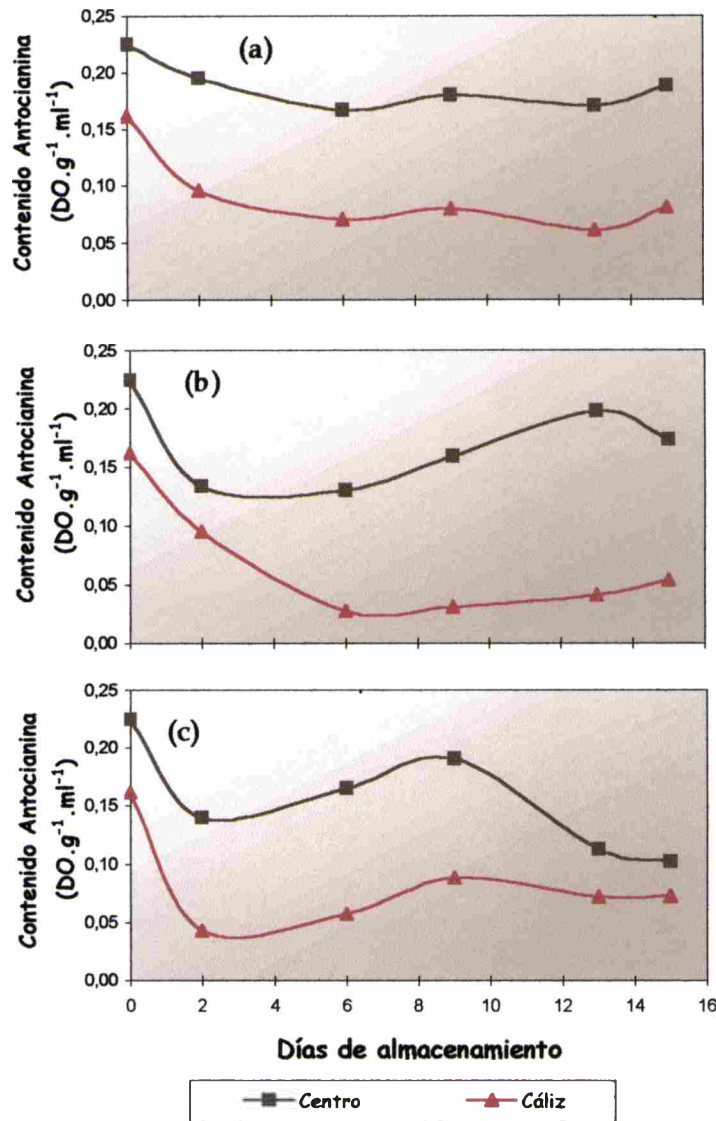


Figura III-12: Variación del contenido de antocianinas en función a los días de almacenamiento a 10°C (a), 5°C (b) y 0°C (c).  
 $LSD_{0.05} (T^*t) = 0.616$  para centro     $LSD_{0.05} (T^*t) = 0.337$  para cáliz

### III - DISCUSION

En el presente trabajo se obtuvo que la zona centro de las berenjenas poseía mayor contenido de antocianinas que la zona cáliz, generando un color púrpura-negro muy oscuro característico de esta variedad (Nothmann y col., 1975), mientras que en la zona cáliz prevalecía un color más claro y púrpura-rojizo.

Todos los parámetros de color analizados presentaron valores diferentes para la zona centro respecto de la zona cáliz. Este hecho llevaría a pensar que posiblemente existiera más de una antocianina y/o que sus concentraciones relativas variaran en la zona centro respecto de la zona cáliz. Cabe destacar que los espectros UV-Visible obtenidos para ambas zonas fueron similares y la única diferencia fueron los distintos valores de absorbancia para cada zona analizada.

La notable diferencia de color entre zona centro y cáliz, observada en frutos recién cosechados, se siguió manteniendo a lo largo del almacenamiento a las distintas temperaturas. Los cambios en los parámetros de color fueron menos significativos en la zona centro que en la zona cáliz. Comparando las tres temperaturas de almacenamiento, sólo aquellas que produjeron daño por frío causaron cambios en los parámetros de color de la zona cáliz de los frutos, aunque 5°C causó variaciones más tardías. En general, la decoloración de la piel del cáliz luego de 2 días estuvo relacionada con la disminución del valor de  $a^*$  y  $Cr$ , mientras que la evolución de las tonalidades marrones-amarillas debidas a la aparición de escaldaduras fue observada a través del incremento de los valores de  $b^*$ ,  $L^*$  y Hue y una disminución de  $a^*$  y  $Cr$ .

Frente al almacenamiento de los frutos, la zona centro continuó presentando mayor contenido de antocianinas respecto de la zona cáliz. Las variaciones halladas en ambas zonas fueron más notorias cuanto más baja era la temperatura y los valores hallados durante el almacenamiento fueron menores respecto del valor inicial. Resultados similares fueron informados por López-Andreu y col. (1988) en su trabajo con otra variedad de berenjenas. Tsuda y col., (1994 y 1996) y Noda y col., (1998) han informado que las

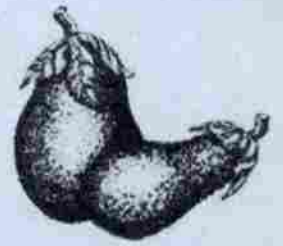
antocianidinas previenen la peroxidación lipídica de la membrana celular y actúan como antioxidantes atrapando radicales libres. También se ha informado que las antocianinas podrían constituir un mecanismo de defensa frente al estrés por baja temperatura (Leng, 1998; Leng y Qi, 2003). Finalmente podría pensarse que, en este trabajo, el mayor contenido de antocianinas de la zona centro haya contribuido a una mayor tolerancia al daño por frío del fruto respecto de la zona cáliz.

A 10°C el contenido de antocianinas no fue afectado en gran medida. Mientras que, a 0 y 5°C se observó una disminución del contenido de antocianinas en los primeros días y un aumento posterior hasta lograr un máximo a los 9 y 13 días de almacenamiento, respectivamente. La disminución inicial podría estar relacionada con el rol de las antocianinas de atrapar las ERO producidas por el almacenamiento a bajas temperaturas como fuera mencionado por Yamasaki, y col., (1996), y Leng y Qi (2003). También, se ha informado que la exposición a bajas temperaturas incrementa la actividad de PAL permitiendo así la producción de diversos compuestos fenólicos incluidas las antocianinas (Rivero y col., 2001; Peiser y col., 1998; Kozukue y col., 1979), lo cual podría estar relacionado con el incremento hallado en nuestro trabajo. Por otro lado, Wang y Stretch (2001) y Connor y col. (2002) han hallado una correlación positiva entre el aumento de antocianinas durante el almacenamiento a bajas temperaturas y la capacidad antioxidante en diversas variedades de arándanos. Por otro lado, Sakamura y col. (1965) y Esteban y col. (1989a) han sugerido que las antocianinas pueden ser sustratos oxidables en las reacciones de pardeamiento enzimático, lo cual podría estar relacionado con la disminución del contenido de antocianinas hallada en nuestro trabajo hacia el final del almacenamiento, tiempo al cual los frutos presentaban desarrollo de punteado y escaldaduras superficiales. A lo largo del almacenamiento a 0°C y en zona cáliz, las variaciones en el contenido de antocianinas se relacionaron con las variaciones del parámetro Cr (menor saturación del color - menor contenido de antocianinas).



### III - CONCLUSIONES

- La zona cáliz presentó mayores valores de  $a^*$ ,  $L^*$  y  $Cr$ , y valores negativos y mayores de  $b^*$  y Hue, respecto de la zona centro.
- El almacenamiento a todas las temperaturas no provocó grandes variaciones de color en la zona centro.
- Para la zona cáliz, la disminución en los valores de  $Cr^*$  a  $0^{\circ}C$  se relacionó con una disminución en el contenido de antocianinas.
- Para la zona cáliz un aumento en los valores de  $b^*$  a  $0^{\circ}C$  estuvo asociado a una disminución en el contenido de antocianinas y a un aumento en el desarrollo de escaldaduras. Esto también se vio reflejado en  $L^*$  y Hue.
- El contenido de antocianinas fue mayor en zona centro respecto de zona cáliz.
- El almacenamiento a  $0$  y  $5^{\circ}C$  causó variaciones en el contenido de antocianinas en ambas zonas del fruto (centro y cáliz), mientras que el almacenamiento a  $10^{\circ}C$  tuvo poca incidencia.



## ***Capítulo IV***

# ***Caracterización y evolución de la actividad PPO durante el almacenamiento***

## IV – INTRODUCCION

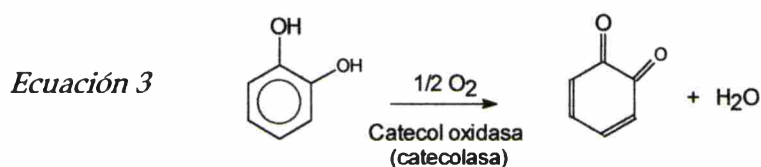
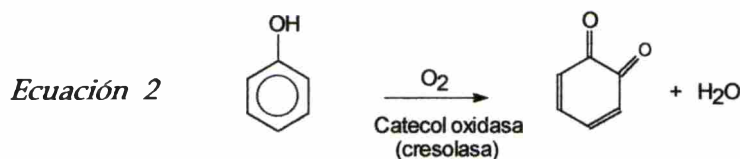
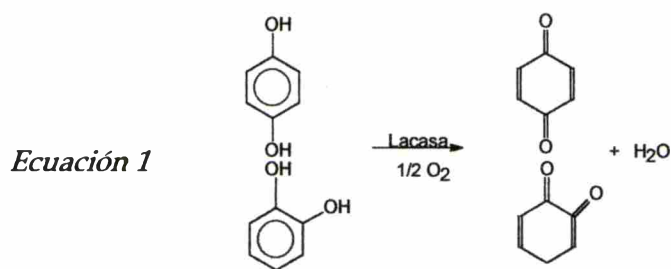
### IV – I. POLIFENOL OXIDASA EN FRUTOS Y HORTALIZAS

La principal enzima oxidativa asociada al desarrollo del pardeamiento es la polifenoloxidasas (PPO).

Tres situaciones diferentes causan pardeamiento en frutos: 1) en algunos casos, la evolución fisiológica relacionada con la maduración; 2) algunos desórdenes ocurridos durante el almacenamiento refrigerado; 3) varios procesos tecnológicos que involucran golpes, cortado, extracción, entre otros (Marques y col., 1995). Varios de estos problemas se conocen desde hace mucho tiempo, pero han recobrado importancia con el incremento del uso de equipamiento mecánico tanto en la cosecha como en el embalado poscosecha de los frutos y en la venta de productos listos para consumir o mínimamente procesados. En todos ellos existe algo en común: el contacto entre compuestos fenólicos localizados predominantemente en vacuola y enzimas oxidativas localizadas en el citoplasma (Mayer y Harel, 1981). La compartimentalización celular es necesaria (en presencia de O<sub>2</sub>) para producir el pardeamiento.

### IV – II. TIPOS DE PPO

La polifenol oxidasa comprende un gran número de enzimas, todas ellas caracterizadas por su habilidad de utilizar la molécula de oxígeno durante la oxidación de los sustratos fenólicos. Se pueden dividir en dos grandes grupos: las lacasas (formalmente las p-difenol:oxígeno oxidoreductasa E.C. 1.10.3.2) y las catecol oxidasas (formalmente o-difenol:oxígeno oxidoreductasa E.C. 1.10.30.1) (Mayer y Harel, 1981). Ambos grupos se han clasificado como monofenol monooxigenasa (E.C. 1.14.18.1). La principal reacción catalizada por la lacasa se muestra en la ecuación 1, mientras que la catecol oxidasa cataliza dos reacciones diferentes (ecuación 2 y 3) (Mayer y Harel, 1981).



La catecol oxidasa se denomina también fenolasa, polifenol oxidasa, tirosinasa, catecolasa o cresolasa. Esta enzima es diferente de la lacasa, la cual oxida a una amplia variedad de compuestos incluyendo los monofenoles, trifenoles y o-,p-difenoles. La única que oxida los p-difenoles es la lacasa. Por el contrario la incapacidad de las o-difenol oxidasas de oxidar p-difenoles es una propiedad típica de estas enzimas. Los términos catecolasa y cresolasa se refieren a la oxidación de difenoles y monofenoles, respectivamente (Mayer y Harel, 1979).

#### IV – 1.2. DISTRIBUCIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PPO

La enzima PPO está ampliamente distribuida en el reino vegetal. Es de fácil detección y ha sido una de las primeras enzimas en ser estudiada. También se ha hallado en bacterias (Mayles, 1975), numerosos hongos (Mayer y Harel, 1981), algas, artrópodos y en todos los mamíferos.

La catecol oxidasa está presente en distintas partes de la planta y del fruto (piel, pulpa y corteza) (Mayer y Harel, 1981). El nivel de catecol oxidasa a menudo cambia marcadamente durante el desarrollo del fruto y es afectada por las condiciones de crecimiento (Mayer y Harel, 1979).

En plantas, han sido descritas PPO en distintas fracciones celulares, tanto en fracciones solubles como en organelas, donde está asociada a membrana (Mayer y Harel, 1981). Técnicas histoquímicas revelan que PPO está localizada en cloroplastos, específicamente en la cara interna de los tilacoides (Shomer y col., 1979). Los genes de PPO son codificados en el núcleo, posterior translación al citoplasma y la proPPO formada transportada al cloroplasto (Vaughn y col., 1988) donde es cortada por proteasas produciendo la forma activa. En algunos casos, se ha hallado actividad PPO en mitocondria (Shomer y col., 1979), peroxisomas y microsomas (Kato y col., 1976). En la bibliografía se ha descrito que la presencia de PPO soluble o asociada a membrana depende del tejido, la especie y el estado de desarrollo. En aceitunas inmaduras, PPO está débilmente unida a cloroplasto, mientras que en el fruto maduro está esencialmente en forma soluble (Ben-Shalom y col., 1977). Prácticamente toda la actividad ha sido encontrada en la fracción soluble cuando el fruto es muy coloreado por las antocianinas. En manzanas, la enzima PPO se halla en plástidos, pero la misma se solubiliza y proteoliza durante la maduración y almacenamiento de los frutos (Murata y col., 1997).

#### IV – 1.3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PPO DURANTE EL CRECIMIENTO, MADURACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Varios estudios sobre PPO han sido desarrollados en frutos con madurez comercial. Sin embargo, la actividad de PPO está en su menor nivel durante este estado fisiológico (Marqués y col., 1995). En realidad, la actividad PPO es generalmente más importante en frutos verdes y jóvenes que en frutos maduros (Mayer y Harel, 1981). Como se mencionó anteriormente hay un cambio en las formas de PPO durante la maduración,

Generalmente, pasa de la forma ligada a membranas a forma soluble, pero la actividad de la última forma es a veces menor que la observada en frutos jóvenes (cerca del 17% en manzana y 4-5% en uvas). Las variaciones en la actividad PPO difieren de acuerdo a las especies de frutos (Marqués y col., 1995). En duraznos, la actividad en la fracción insoluble se incrementa durante la maduración, mientras que cae considerablemente y termina siendo menor que la fracción soluble cuando el fruto es cosechado (Harel y col., 1970). En palta, una creciente actividad de PPO de la fracción insoluble, relativa a la fracción soluble o citosólica, es observada cuando el fruto madura (Marqués y col., 1995).

## IV – OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar la actividad PPO extraída de la pulpa de berenjenas Money Maker N°2 y analizar la variación en su actividad catecolasa durante el período de almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas.

## **IV - MATERIALES Y METODOS**

### **IV-1. Material vegetal y almacenamiento**

Las experiencias se llevaron a cabo empleando berenjenas cuya variedad, estado de madurez y procedencia son similares a las descritas en Materiales y Métodos del Capítulo I, sección I-1 (I-MyM: I-1).

Las berenjenas se distribuyeron al azar en grupos de 6 frutos. Cada grupo se empacó en bolsas de LDPE perforadas (como se indicó en I-MyM: I-1) y luego se almacenaron a 0 y 10°C por 12 días. Las determinaciones fueron efectuadas al inicio y luego de 2, 6, 8 y 12 días de almacenamiento.

Una vez que los frutos fueron retirados de las cámaras, al día de muestreo correspondiente, se les evaluó el avance del daño por frío mediante el valor de índice de daño. Luego se tomó la sección ecuatorial de cada fruto, se peló, fraccionó en pequeñas porciones, se congeló en nitrógeno líquido y finalmente se almacenó a -20°C hasta su posterior empleo en la obtención de los extractos enzimáticos.

### **IV-2. Desarrollo del daño por frío**

A cada día de muestreo, se evaluaron visualmente los síntomas de daño por frío en la pulpa y piel de las berenjenas. Los índices de daño se expresaron de acuerdo a lo descrito en I-MyM: I-2.

### **IV-3. Pardeamiento de la pulpa**

El valor de  $L_0$  se determinó según se describió en I-MyM: I-4.

#### IV-4. Extracción enzimática

Se efectuaron tres tipos de extractos crudos a partir de tejido de fruto congelado, de acuerdo a Serradell y col. (2000). Cada extracción se efectuó por duplicado.

- *Extracto soluble en buffer fosfato:* Dos gramos de tejido congelado se trituraron en un molinillo (Modelo A10 Janke & Kunkel - IKA Labortechnik), y luego se adicionaron a 10 ml de buffer fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 6) conteniendo polivinilpirrolidina (PVPP) 30 g l<sup>-1</sup>. Se agitó la suspensión resultante por 30 min a 4°C, se centrifugó a 11200 × g por 15 min y a 4°C (Sorvall RC 5B Plus). Se separó el sobrenadante (conteniendo la "fracción soluble"), se distribuyó en alícuotas y finalmente se almacenó cada alícuota a -80°C hasta ser usada.
- *Extracto insoluble en buffer fosfato:* El residuo sólido obtenido en la extracción anterior se resuspendió en 10 ml de buffer fosfato frío ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 6) conteniendo Tritón X-100 0,1% v/v y PVPP 30 g l<sup>-1</sup>. La suspensión resultante se agitó por 60 min a 4°C, se centrifugó a 11200 × g por 15 min a 4°C. Se separó el sobrenadante (conteniendo la "fracción insoluble"), se distribuyó en alícuotas y finalmente se almacenó cada alícuota a -80°C hasta ser usada.
- *Extracto total:* Dos gramos de pulpa congelada en nitrógeno líquido y pulverizada en un molinillo se adicionaron a 10 ml de buffer fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 6) conteniendo Tritón X-100 0,1% v/v y PVPP 30 g l<sup>-1</sup>. La suspensión resultante se agitó por 60 min a 4°C, se centrifugó a 11200 × g por 15 min a 4°C. Se separó el sobrenadante (conteniendo la "fracción total"), se distribuyó en alícuotas y finalmente se almacenó cada alícuota a -80°C hasta ser usada.

#### IV-5. Medida de la actividad enzimática de PPO

La actividad PPO se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU 650 de acuerdo a Yue-Ming y col. (1997), y Shatta y El-Samei, (1999) con pequeñas modificaciones. La mezcla de reacción contenía 4-metilcatecol 0,012 M en buffer fosfato

---



( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 6) y 75  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático en un volumen final de mezcla de reacción de 500  $\mu\text{l}$  (15% de volumen de extracto respecto del volumen final de reacción). El blanco de referencia se preparó mezclando todos los componentes con el extracto enzimático hervido. La reacción se llevó a cabo a 30°C y se registró el cambio de absorbancia a 410nm. La actividad enzimática se calculó como el cambio en absorbancia por min en la porción lineal inicial de la curva. Las mezclas de reacción fueron preparadas por triplicado, para cada tipo de extracto crudo. Los resultados se expresaron como ( $\Delta\text{DO}$  mg prot<sup>-1</sup>).

#### IV-6. Determinación del contenido de proteína

El contenido proteico de cada tipo de extracto se determinó por el método de Bradford (1976) usando albúmina bovina como estándar proteico. Los resultados se expresaron como (g prot . kg tejido fresco<sup>-1</sup>).

#### IV-7. Caracterización de la enzima PPO

Todas las determinaciones que se mencionan a continuación se llevaron a cabo empleando extracto crudo total perteneciente a frutos recién cosechados.

- *Especificidad de sustrato:* La actividad PPO fue determinada empleando dos sustratos: 4-metil catecol (4-MC) y pirocatecol (PC). Tanto la mezcla de reacción como la determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección previa, usando 0,01 M como concentración final de cada sustrato. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.
- *Optimización de la concentración de sustrato y enzima:* La actividad PPO se ensayó a 410 nm, como se indicó en la sección 5, pero variando la cantidad de 4-MC en un rango de 2 a 12 mM.

Para determinar la cantidad de extracto a emplear, se determinó la actividad PPO como se indicó en la sección 5, y se estudió el efecto del porcentaje de extracto enzimático entre 5 y 35 % v/v con respecto al volumen final de mezcla de reacción. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Se calcularon los valores de la constante aparente de Michaelis ( $K_m$ ) y velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de acuerdo al método de Lineweaver-Burk (1934).

- *pH óptimo*: Se midió la actividad PPO empleando buffer Mc-Ilvaine entre pH 3 y 7. La actividad PPO se determinó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.
- *Temperatura óptima*: La actividad PPO se midió entre 5 y 60°C como se indicó en la sección 5. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y la actividad enzimática de cada medida se expresó como el porcentaje relativo a la mayor actividad lograda.
- *Estabilidad térmica*: Un ml de extracto enzimático soluble e insoluble se incubó por 30 y 60 min a 0, 5, 10 y 20°C. La actividad enzimática residual se midió bajo condiciones detalladas en la sección 5. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.
- *Activación por SDS*: El extracto enzimático fue incubado con dodecilsulfato de sodio (SDS) por 5 min. La concentración de SDS en el medio de reacción varió entre 0 y 2 mM. La reacción se inició por el agregado al medio de reacción de los 75  $\mu$ l de la enzima tratada y la actividad se midió de acuerdo a lo descrito en la sección 5.

#### IV-8. Análisis estadístico

Se empleó un diseño factorial, los resultados fueron procesados mediante un ANOVA y las medias comparadas por el test LSD con una significancia de 0,05 usando el software SYSTAT.

## IV - RESULTADOS

### IV-1. Caracterización enzimática

#### IV-1.1. Especificidad de sustrato

La actividad catecolasa de PPO se determinó usando 4-MC y PC como sustratos. La enzima mostró una actividad específica significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor cuando 4-MC se empleó como sustrato (Tabla IV-1), y consecuentemente este sustrato se seleccionó para ensayos futuros.

**Tabla IV-1:** Especificidad de sustratos de fracción total de PPO extraída de berenjenas Money Maker N°2.

Sustrato (0,01 M)	Actividad ( $\Delta\text{DO} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Actividad relativa (%)	Actividad específica <sup>a</sup> ( $\Delta\text{DO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ )
PC	$0,030 \pm 0,002$	37	$4,04 \pm 0,21$
4-MC	$0,081 \pm 0,0003$	100	$10,99 \pm 0,03$

<sup>a</sup> la actividad específica se determinó espectrofotométricamente a 410 nm, 30°C y concentración de sustrato 0,01 M en buffer fosfato pH 6.

#### IV-1.2. Efecto de la concentración del sustrato

Se investigó el efecto de la concentración de 4-MC sobre la actividad catecolasa de PPO. Los valores de  $K_m$  aparente y  $V_{m\acute{a}x}$  fueron 3,24 mM y 0,10  $\Delta\text{DO} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente. De acuerdo a estos resultados se observó que 12 mM de 4-MC era la concentración apropiada para utilizar en futuras determinaciones de la actividad PPO.

#### IV-1.3. Efecto de la concentración de extracto enzimático

Se determinó la actividad de PPO en función del porcentaje de extracto crudo empleado. Usando 4-MC como sustrato, la actividad específica mostró un incremento lineal con la concentración de enzima hasta alcanzar un máximo cuando se empleó un 25%

(v/v) de extracto (datos no mostrados). De acuerdo a ello, en adelante se empleó 15 o 20 % (v/v) de extracto para efectuar la determinación de la actividad de PPO.

IV-1.4. Efecto del pH

El pH es un factor crucial en la determinación de la actividad enzimática. La variación de actividad con el pH se muestra en la figura IV-1. En el extracto crudo total la actividad enzimática fue máxima en un rango de pH entre 4,8 y 6,0. Por debajo de pH 4,8 la actividad cayó rápida y significativamente ( $p < 0,05$ ), mientras que hubo una leve disminución a partir de pH 6,0. Posteriormente se determinó la actividad en función del pH en extractos conteniendo las fracciones enzimáticas soluble o insoluble a efectos de analizar si se comportaban de igual modo. Los resultados mostraron que la fracción soluble de PPO (fig. IV-1) poseía una actividad comparable a la observada para la fracción de PPO total. Mientras que la actividad en la fracción insoluble tuvo un valor máximo a pH 5,7 (fig. IV-1), siendo este valor de actividad inferior al obtenido para las otras fracciones.

De acuerdo a los resultados encontrados se estableció el empleo de un buffer con pH 6 para la determinación de la actividad de PPO.

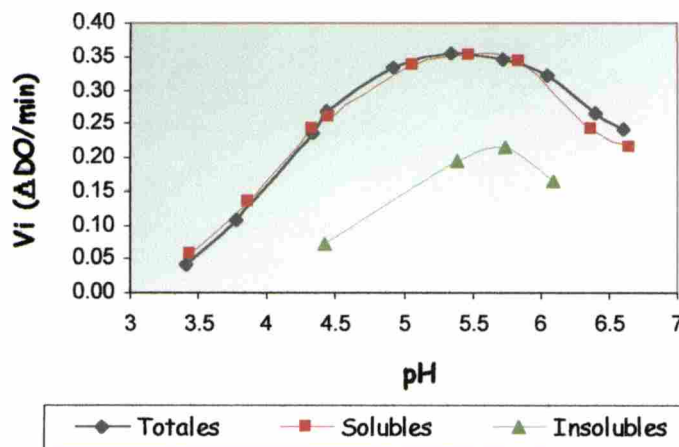


Figura IV-1: Efecto del pH sobre la actividad de las fracciones de PPO soluble, insoluble y total extraídas de berenjenas Money Maker N°2.  $LSD_{0,05} = 0,03$

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

#### IV-1.5. Efecto de la temperatura

El mayor interés reside en poder analizar el efecto de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la actividad de PPO, por lo tanto se estudió su actividad enzimática a bajas temperaturas (0, 5 y 10°C) y a temperaturas mayores (entre 15 y 60°C). La figura IV-2 muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de PPO. La mayor actividad PPO se obtuvo a 30°C y por lo tanto dicho valor fue tomado como aquel que poseía el 100 % de actividad específica. Entre temperaturas de 0 y 35°C, se observaron actividades relativas superiores al 85 %, denotando que a las temperaturas de almacenamiento que causaron daño por frío en berenjenas la enzima poseía una actividad alta (82 y 88 % a 0 y 5°C, respectivamente). Mientras que, la actividad enzimática disminuyó drásticamente a temperaturas mayores a 30°C, llegando a poseer un 48 % de actividad relativa a los 60°C.

De acuerdo a los resultados hallados se tomó 30°C como temperatura óptima para la determinación de actividad.

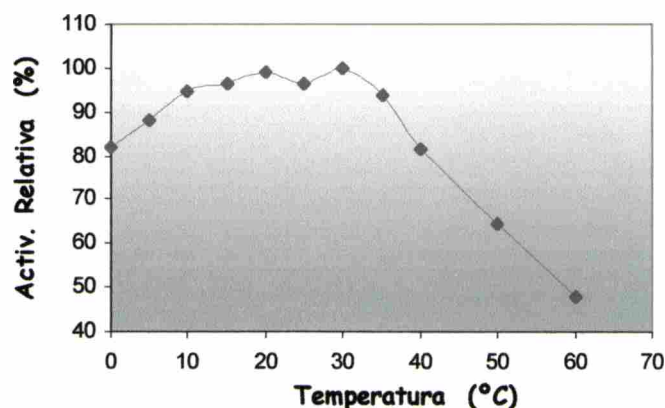


Figura IV-2: Efecto de la temperatura sobre la actividad PPO (fracción total) extraída de berenjenas Money Maker N°2. Cada punto representa la actividad relativa porcentual respecto del valor máximo alcanzado a los 30°C.  $LSD_{0,05} = 2,30$ .

#### IV-1.6. Estabilidad térmica de PPO

Debido a que los frutos se almacenaron a bajas temperaturas, se analizó la estabilidad de la enzima a temperaturas cercanas a las mismas, tanto de la fracción soluble de PPO como de la insoluble.

Las figuras IV-3a y IV-3b muestran la actividad residual de las fracciones solubles e insolubles, respectivamente, luego de ser sometidas a las temperaturas de 0, 5, 10 y 20°C durante 30 y 60 min. La fracción soluble de PPO mostró una actividad residual superior al 85 % luego de 30 min de incubación a todas las temperaturas. Mientras que, luego de 60 min de tratamiento se registraron valores cercanos al 90 % a 5, 10 y 20°C de temperatura de incubación, y un valor del 80% de actividad residual a 0°C.

La fracción de PPO insoluble mostró una disminución abrupta de la actividad luego de 30 min de incubación a todas las temperaturas, alcanzando un 40% de actividad residual similar ( $p>0,05$ ) al hallado luego de 60 min de incubación a cualquiera de las temperaturas analizadas.

Estos resultados demuestran que la fracción de PPO soluble es significativamente menos sensible a las bajas temperaturas que la fracción insoluble.

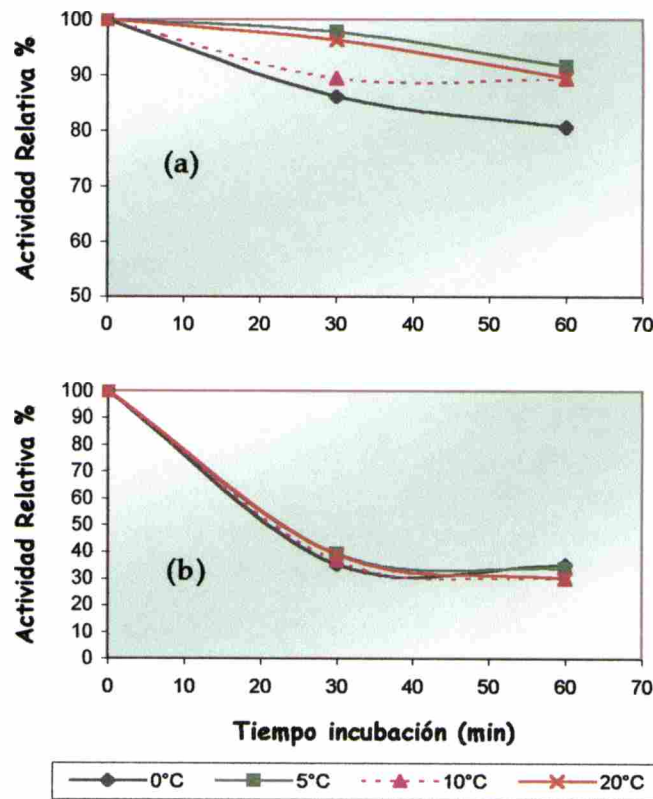


Figura IV-3: Estabilidad térmica de las fracciones de PPO soluble (a) e insoluble (b) en relación con el tiempo de incubación a las distintas temperaturas. Los valores representan la actividad relativa expresada como porcentaje del valor máximo inicial.  $LSD_{0,05} = 0,65$ .

#### IV-1.7. Efecto del agregado de SDS

Se llevó a cabo un estudio de activación enzimática en presencia de SDS. Moor y Flurky (1990) sugirieron que el efecto en el proceso de activación enzimática es el resultado de un cambio conformacional debido a la unión de una pequeña cantidad de SDS al sitio activo. En el presente trabajo, no se registraron variaciones luego de la incubación de la enzima con diferentes concentraciones de SDS por 5 min (datos no mostrados). El tiempo y concentraciones de SDS empleadas aquí fueron similares a las condiciones usadas para causar la activación de la enzima PPO en lechuga (Chazarra y col., 1996), remolacha rallada (Escribano y col., 1997) y pera (Gauillard y Richard-Forget, 1997).

#### IV-2. Actividad PPO en las distintas fracciones enzimáticas

En células de frutos se ha encontrado actividad PPO tanto en forma soluble, como asociada a membrana o insoluble (Mayer y Harel, 1979). Por lo tanto, en el presente trabajo de Tesis, se extrajo la enzima PPO en presencia y ausencia de Tritón X-100.

En la tabla IV-2 se muestra el contenido de proteínas y la actividad catecolasa específica de PPO de las fracciones soluble, insoluble y total. En ella puede verse que el 65% del contenido total de proteína se halló en la fracción soluble. Por otro lado, todos los extractos mostraron actividad PPO (Tabla IV-2) cuando la misma se determinó bajo las condiciones elegidas anteriormente. La actividad específica de PPO soluble fue el doble respecto del valor alcanzado por la fracción insoluble.

**Tabla IV-2:** Contenido de proteína y actividad específica de PPO en las fracciones soluble, insoluble y total obtenidas de pulpa de berenjenas Money Maker N°2

Fracciones	Proteína (g prot. kg <sup>-1</sup> )	Actividad específica (ΔDO. min <sup>-1</sup> . mg prot <sup>-1</sup> )
Soluble	1,59 ± 0,12	5,64 ± 0,77
Insoluble	0,62 ± 0,03	2,86 ± 0,13
Total	2,50 ± 0,01	9,02 ± 0,82

### IV-3. Cambios de la actividad PPO durante el almacenamiento de los frutos

A fin de determinar el efecto causado por el almacenamiento sobre cada fracción de PPO, se analizó la actividad enzimática de los extractos crudos tanto solubles como insolubles extraídos de frutos almacenados durante 12 días a 10° y 0°C.

A 10°C, la actividad específica (fig. IV-4a) de la fracción soluble de PPO se mantuvo prácticamente invariable hasta el día 8 y finalmente aumentó un 76 % al día 12. Por otro lado, la actividad PPO en la fracción insoluble permaneció relativamente constante hasta el día 6 y luego registró un aumento hasta alcanzar un valor 30 % superior al inicial a los días 8 y 12. En general, la actividad de PPO soluble fue mayor que la actividad de PPO insoluble durante todo el período de almacenamiento.

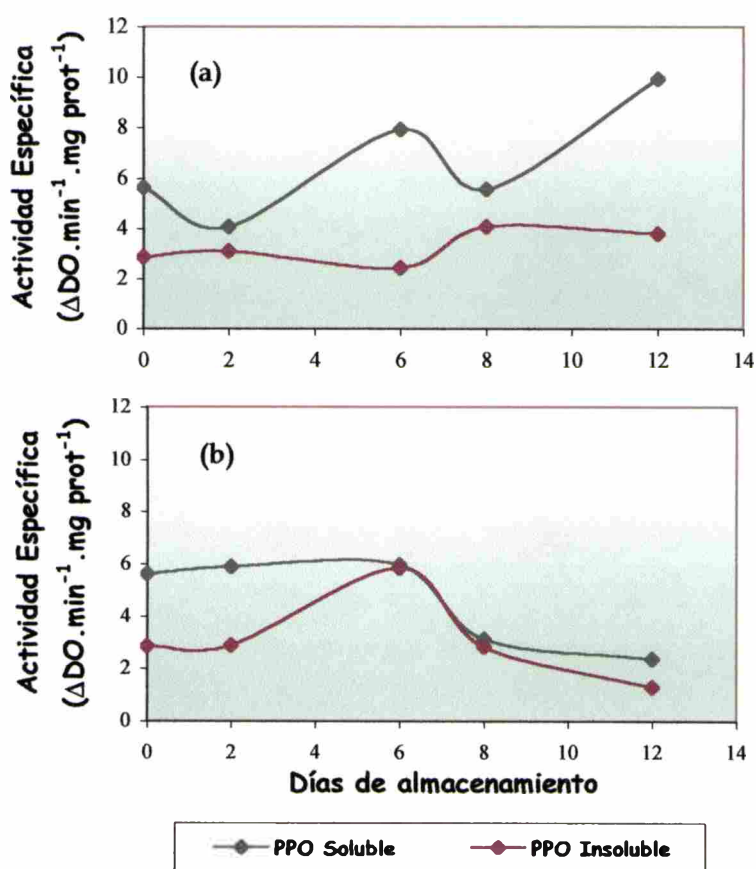


Figura IV-4: Evolución de la actividad específica de las fracciones de PPO soluble e insoluble en función del tiempo de almacenamiento de los frutos a 10°C (a) y 0°C (b). LSD<sub>0,05</sub>= 0,76.



A 0°C (fig. IV-4b), la actividad específica de la fracción soluble de PPO permaneció relativamente constante hasta el día 6 y luego disminuyó a valores cercanos al 50 % respecto del valor inicial a los días 8 y 12. Mientras que, la fracción insoluble de PPO exhibió un incremento al día 6 alcanzando el doble de actividad respecto del valor inicial, para luego disminuir paulatinamente alcanzando un valor 50 % menor al inicial al día 12. Las fracciones de PPO soluble e insoluble no mostraron diferencias a partir del día 6 de almacenamiento a 0°C.

De acuerdo a estos resultados el almacenamiento prolongado de los frutos causó un aumento de la actividad PPO soluble e insoluble a 10°C y una disminución de las mismas a 0°C.

#### IV-5. Evolución del daño por frío

Los resultados obtenidos fueron similares a los detallados en I-R: I-2. Por lo tanto, sólo se recordará que esta variedad de berenjena no sufre daño por frío frente al almacenamiento a 10°C, a diferencia de la exposición a 0°C.

#### IV-6. Pardeamiento de la pulpa

Los resultados obtenidos fueron similares a los detallados en I-R: I-3. Por lo tanto, sólo se recordará que a 10°C el tejido mostró valores constantes de  $L_0$ , denotando que el tejido no se pardeó. Mientras que a 0°C los valores de  $L_0$  disminuyeron con el transcurso del tiempo de almacenamiento a esta temperatura de daño, mostrando que a los 8 y 12 días la pulpa había perdido luminosidad debida al pardeamiento.

## IV – DISCUSION

Se caracterizó parcialmente la actividad catecolasa de la enzima PPO, hallándose que 4-MC fue el sustrato de mayor especificidad y su concentración óptima fue 12 mM, generando una  $K_m$  aparente de 3,24 mM y  $V_{m\acute{a}x}$  de 0,10  $\Delta DO \cdot \text{min}^{-1}$ . También se empleó este sustrato para la determinación de PPO en berenjena cv Belleza Negra (Perez-Gilabert y García-Carmona, 2000), pericarpio de litchi (Yue-Ming y col., 1997) y manzana (Trejo-González y Soto Valdez, 1991). El valor de  $K_m$  aparente hallado en esta oportunidad resultó ser comparable al obtenido para berenjena cv Belleza Negra (Perez-Gilabert y García-Carmona, 2000) y palmito (Robert y col., 1996), pero menor que el informado para pera (Gauillard y Richard-Forget, 1997) y zarzamora (González y col., 2000). En el presente trabajo se halló una mayor actividad al emplear 15% (v/v) de volumen de extracto enzimático en la mezcla de reacción. El pH óptimo se estableció en 6 para la fracción total y soluble de PPO. Shatta y El-Shamei (1999) hallaron un valor de pH óptimo igual a 7 empleando la fracción soluble de PPO perteneciente a berenjena cv Black Beauty. Finalmente la temperatura óptima fue de 30°C. Este valor se halla en el rango de temperaturas óptimas de entre 25 y 40°C informadas para manzana (Trejo-González y Soto-Valdez, 1991), mango (Arogba y col., 1998) y níspero (Ding y col., 1998), entre otras.

Posteriormente se determinó la actividad catecolasa de la enzima durante el almacenamiento refrigerado de berenjena. La actividad de la fracción soluble de PPO fue mayor que la de la fracción insoluble al inicio de la experiencia y durante el almacenamiento a 10°C mientras que, fueron comparables durante casi todo el almacenamiento a 0°C.

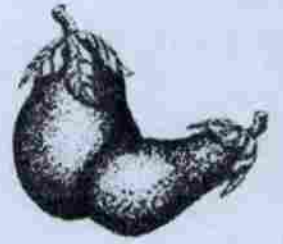
Las actividades de las fracciones soluble e insoluble de PPO mostraron un aumento cuando los frutos estuvieron almacenados a 10°C. Si bien el tejido no desarrolló pardeamiento de la pulpa durante el almacenamiento, cuando los frutos eran cortados y la pulpa expuesta al aire se produjo un rápido oscurecimiento de la misma. Por otro lado, el almacenamiento a 0°C provocó al día 8 una disminución de la actividad de PPO soluble e insoluble cuando el pardeamiento en pulpa fue evidente. Coseteng y Lee (1987) y Cheng y

Crisosto (1995) trabajando en manzana y durazno, respectivamente, hallaron resultados comparables a los detallados recientemente.

La enzima PPO es capaz de oxidar compuestos fenólicos y ese proceso está relacionado con el deterioro del fruto (Grace y col., 1998; Lafuente y col., 1997; Das y col., 1997). Cuando la estructura celular se ve alterada, los compartimentos celulares que separan la enzima de los sustratos son desorganizados, y por lo tanto PPO y los compuestos fenólicos entran en contacto para producir las quinonas poliméricas por oxidación enzimática. En nuestro trabajo, existe una correlación lineal entre la actividad de PPO soluble a 0°C y el valor de  $L_0$  ( $r = 0,991$ ;  $p = 0,009$ ). Así, altos valores de actividad enzimática se correspondieron con altos valores de  $L_0$ , y bajos valores de actividad con bajos valores de  $L_0$ . Es probable que la disminución de la actividad PPO a 0°C pueda ser atribuida a cambios estructurales de la enzima o a una disminución en el contenido de PPO. Como nuestras determinaciones fueron hechas sobre la base de un contenido total de proteínas, no es posible detectar variaciones en el contenido de PPO. Por lo tanto, se necesitará continuar con los ensayos tendientes a conocer más acerca de este punto.

## IV - CONCLUSIONES

- Como resultado de la caracterización parcial de la enzima PPO se obtuvo a 4-metilcatecol 12 mM como sustrato, 15 % v/v de volumen de extracto enzimático, buffer con pH 6 y temperatura de 30°C.
- La actividad PPO de la fracción soluble fue el doble respecto de la actividad de la fracción insoluble.
- A 10°C, la actividad específica de ambas fracciones de PPO aumentó con el período de almacenamiento.
- A 0°C, la actividad específica de ambas fracciones de PPO disminuyó cuando la pulpa de los frutos presentó desarrollo de pardeamiento.
- En esta variedad de berenjenas, existe una correlación lineal entre la actividad de PPO soluble a 0°C y el valor de  $L_0$  ( $r = 0,991$ ;  $p = 0,009$ ).



## ***Capítulo V***

# ***Aplicación de técnicas poscosecha para retardar el daño por frío***

## V – INTRODUCCION

### V – I. REDUCCIÓN DEL DAÑO POR FRÍO EN POSCOSECHA

La pérdidas poscosecha debidas al daño por frío son probablemente mayores a las que se reconocen realmente. A menudo, los síntomas de daño por frío no son apreciables mientras el producto permanece bajo almacenamiento refrigerado, sino que dichos síntomas aparecen más tarde, cuando el producto es transferido al mercado donde la temperatura es mayor. En el mercado, una porción sustancial de pérdidas que resultan del daño por frío son asignadas erróneamente a la inducción de patógenos o a desórdenes de maduración (Wang, 1994a).

El almacenamiento a bajas temperaturas es considerado el método más efectivo para mantener la calidad de la mayoría de frutos y vegetales, debido a que la baja temperatura retarda la respiración, la producción de etileno, la maduración, la senescencia, cambios metabólicos indeseables y decaimiento (Hardenburg y col., 1986). Desafortunadamente, para productos sensibles al daño por frío, tales como aquellos de origen tropical, el almacenamiento a baja temperatura es a menudo perjudicial en vez de beneficioso. Sin embargo, si los mismos no son refrigerados tienden a deteriorarse rápidamente y poseen una vida útil poscosecha corta. El dilema resulta en pérdidas poscosecha importantes para los productos tropicales, si éstos manifiestan el daño por frío.

### V – II. TÉCNICAS POSCOSECHA PARA REDUCIR EL DAÑO POR FRÍO

Existen numerosas técnicas poscosecha que potencialmente pueden reducir o evitar la incidencia del daño por frío. Algunas de ellas son: tratamiento térmico, calentamiento intermitente, atmósfera controlada, tratamientos químicos, aplicación de reguladores de

crecimiento, encerado y otras coberturas, y embalado. Las primeras tres técnicas involucran manipular y modificar el entorno de almacenamiento, mientras que los demás métodos involucran un tratamiento directo del producto. Estas técnicas reducen el daño por frío tanto por incrementar la tolerancia del producto a la temperatura de daño o por el retardo del desarrollo de los síntomas. Algunas de estas técnicas son más efectivas que otras en ciertos productos, y las condiciones óptimas varían con los diferentes productos y variedades.

- a) **Tratamiento térmico:** las temperaturas de pre-almacenamiento empleadas pueden ser bajas o altas.

En aquellos casos en que se emplea *baja temperatura*, se expone el producto a temperaturas ligeramente mayores al rango crítico de daño por frío lo cual aumenta la tolerancia a la posterior exposición al daño por frío. Estos preacondicionamientos pueden efectuarse en un solo paso o en varios, siendo esta última opción la más efectiva. Usualmente estos pre-acondicionamientos a bajas temperaturas están asociados con el mantenimiento de altos niveles de fosfolípidos en membrana, incremento del grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, supresión del incremento en la relación esterol:fosfolípido, incremento de la concentración de poliaminas, escualeno y aldehídos de cadena larga (Wang, 1994a).

También se emplean *pre-tratamientos con altas temperaturas*. Estos tratamientos reducen la pérdida de peso, proveen protección contra la invasión de microorganismos durante el subsiguiente almacenamiento refrigerado. La protección contra el daño por frío en esta técnica está asociada a la acumulación de proteínas de heat-shock (Lurie y Klein, 1991).

- b) **Calentamiento intermitente:** Es la interrupción del almacenamiento a baja temperatura con uno o más períodos de temperaturas cálidas. Este tratamiento debe ser aplicado antes de que el daño por frío sea irreversible. La hipótesis empleada para efectuar este tipo de tratamiento es que el aumento de temperatura en el medio de una exposición refrigerada usualmente induce a actividades metabólicas mayores y permite que el

tejido metabolice el exceso de productos intermediarios o tóxicos acumulados durante la refrigeración (Pentzer y Heinze, 1954). El calentamiento de tejidos refrigerados por períodos cortos también ayuda a reparar membranas, organelas o pasos metabólicos y aprovisionar sustancias que habían sido agotadas o que eran difíciles de sintetizar durante la refrigeración (Wang, 1982). También se postula que puede existir una elongación y desaturación de los ácidos grasos (Fukushima y col., 1979).

- c) **Atmósfera controlada:** Este método puede ser beneficioso, perjudicial o inefectivo en la reducción del daño por frío. Consiste en modificar intencionalmente la atmósfera que rodea a los productos almacenados disminuyendo el nivel de O<sub>2</sub> e incrementando el de CO<sub>2</sub>. En frutos que producen etileno, este es removido de la atmósfera (Wang, 1994a). El uso de este tipo de tecnología se justifica para productos que admitan una larga conservación y que se puedan almacenar en grandes cantidades.
- d) **Tratamientos químicos:** Los químicos que tienden a disminuir el daño por frío son: Ca, benzoato de sodio, imazalil, tiabendazol, aceites minerales, aceites vegetales y escualeno (Wang, 1994a). El Ca confiere rigidez a las paredes y membranas celulares y ayuda al tejido a soportar el daño por frío. El benzoato de sodio es una sustancia que consume radicales libres y reduce así la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana. Los fungicidas imazalil y tiabendazol inhiben la infección latente, reducen el punteado y retardan la senescencia de la piel de naranjas y pomelos (McDonald y col., 1990; Schiffmann-Nadel y col., 1972). Los aceites minerales previenen la decoloración debajo de la piel de bananas. El aceite vegetal tiene propiedades antitranspirante y antioxidante. El escualeno es un compuesto ceroso natural de la piel de los pomelos y aplicado adicionalmente protege a los mismos del daño por frío.
- e) **Reguladores de crecimiento:** Estos compuestos afectan varios procesos bioquímicos y fisiológicos del tejido de las plantas. Ellos son: ácido jasmónico o su derivado metil jasmonato (MJ), ácido absísico (ABA), etileno, tiazoles y poliaminas (Wang, 1994a). Los jasmonatos poseen una regulación similar a la de ABA. El ABA induce el cierre de los estomas, reduce la pérdida de peso, previene el pardeamiento de plantas de semillero,



suprime la pérdida de electrolitos y previene la pérdida o reducción de glutatión y fosfolípidos de membrana. El efecto del etileno está mediado por su efecto sobre la maduración. Los tiazoles protegen a los componentes de la membrana celular del daño por oxidación por incremento de los mecanismos de defensa del tejido contra el ataque de radicales libres. El efecto de las poliaminas está relacionado con su actividad antioxidante y efecto estabilizador de membranas.

- f) **Encerado y otras coberturas:** El encerado de frutos y vegetales restringe el intercambio de gases y transpiración del producto fresco, y por lo tanto tiene un efecto similar al empacado en películas. Otras coberturas usadas son aceites vegetales o emulsiones de aceite vegetal y agua.
- g) **Empacado con películas o atmósfera modificada:** Consiste en cubrir con películas plásticas los productos en forma individual o formando grupos a fin de mantener alta humedad relativa y modificar la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en la atmósfera que rodea al producto.

## V – 2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

### V – 2.1. Métodos

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de tratamientos térmicos poscosecha tendientes a controlar el desarrollo de insectos y de hongos (Couey, 1989; Barkai-Golan y Philips, 1991; Lurie, 1998a y b). También los tratamientos térmicos incrementan la tolerancia al frío y puede ser comercialmente utilizado para reducir el daño por frío de frutos y hortalizas (Hatton, 1990; Wang, 1993; Lurie, 1998a y b). Parte de este interés se debe a la creciente demanda para disminuir el uso poscosecha de químicos contra patógenos e insectos. El tratamiento térmico propone un tratamiento físico no dañino a cambio de la prevención química.

Existen tres métodos para llevar a cabo la aplicación del tratamiento térmico:

- **inmersión en agua caliente:** fue originariamente usado para el control fúngico, pero su uso se extendió también a la desinfección de insectos y retardo del daño por frío. La inmersión poscosecha para prevenir el decaimiento es usualmente aplicada por unos pocos minutos y a temperaturas elevadas. Se han aplicado por ejemplo: tratamientos de 2-3 min a 53°C en cítricos (Schirra y Ben-Yehoshua, 1999), 42 min a 45°C en naranjas (Williams y col., 1994), entre otros.
- **vapor caliente:** el empleo de vapor caliente se desarrolló específicamente para el control de insectos, aunque también es empleado para el retardo del daño por frío. Se han aplicado tratamientos de 15 min a 46,5°C en mangos maduros (Jacobi y col., 1995).
- **aire caliente:** ha sido usado para controlar tanto el desarrollo fúngico como el de insectos, como así también para analizar la respuesta de los frutos y hortalizas a las altas temperaturas. En el tratamiento con aire caliente se calienta más lento que en la inmersión o el tratamiento con vapor. Se han aplicado por ejemplo: tratamientos de 3 días a 37°C en tomates (Cheng y col. 1988), 4 días a 43°C en manzanas (Klein y Lurie, 1990), 10 min a 46°C en mangos inmaduros (Jacobi y col., 1995), entre otros.

Los últimos dos métodos (vapor y aire caliente) pueden efectuarse con aire relativamente estático o con un flujo de aire bajo; y en forma adicional el aire puede poseer control de humedad o no. Todas estas combinaciones afectan tanto la respuesta de los frutos y hortalizas al tratamiento térmico como el período de tiempo a emplear para lograr el efecto deseado.

## V - 2.2. Respuesta de los frutos y vegetales

La maduración de varios frutos climatéricos está caracterizada por ablandamiento del tejido, un incremento en la relación azúcar:ácido, desarrollo de color e incremento de la respiración y producción de etileno. La exposición de los frutos a altas temperaturas atenúa algunos de esos procesos mientras que incrementa otros.

El retardo de la maduración debida al tratamiento térmico podría estar ligada por el efecto de la hormona de la maduración, etileno. Dicha síntesis es inhibida en forma

reversible por las altas temperaturas (Field, 1984). La conversión de ACC a etileno es susceptible al daño por calentamiento a más de 30°C (Yu y col., 1980). Tratamientos con aire caliente a 35-40°C inhibe la síntesis de etileno durante horas en manzana y tomate (Biggs y col., 1988). Temperaturas de 35-38°C pueden causar la acumulación de ACC endógeno y la concomitante disminución de etileno (Yu y col., 1980). Una rápida pérdida de la actividad de ACC oxidasa ocurre en varios frutos expuestos por unas pocas horas a inmersión en agua caliente a 42-46°C (Dunlap y col., 1990), debido a la disminución en mRNA de ACC oxidasa y cesación de la síntesis enzimas (Lurie y col., 1996)

Frutos expuestos a extensos tratamientos en aire caliente a 38-40°C a menudo se ablandan más lentamente que los frutos no tratados (Biggs y col., 1988). Esto puede deberse a la inhibición de la síntesis de enzimas hidrolíticas de pared celular, tal como poligalacturonasa (Chan y col., 1981) y  $\alpha$ - y  $\beta$ - galactosidasa (Sozzi y col., 1996). Estudios de pared celular en manzana han revelado un menor contenido de pectinas solubles y mayor de pectinas insolubles luego de la exposición en aire a 38°C por 4 días (Klein y col., 1990).

La velocidad de respiración de frutos maduros se incrementada frente a la exposición a altas temperaturas (Klein y Lurie, 1990). La respuesta a la temperatura varía con la edad fisiológica del tejido. El coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) de manzanas disminuye de 2,8 en frutos jóvenes a 1,6 luego de las 6 semanas posteriores, en el rango de 10-30°C (Jones, 1981).

Los frutos y vegetales tratados térmicamente previo a su exposición a bajas temperaturas muestran una mayor tolerancia al daño por frío. Este tema se abordará con mayor detalle en la sección V-2.4.

### V – 2.3. ¿Qué provoca la termo-tolerancia?

El mecanismo por el cual los tratamientos térmicos causan cambios en la maduración y respuesta de los frutos al estrés térmico, tales como inhibición de la síntesis de etileno y de enzimas que degradan la pared celular está asociado a cambios en la

expresión de genes y síntesis de proteínas. Durante un tratamiento a alta temperatura, el mRNA de genes asociados a la maduración desaparece y aquel de proteínas de heat shock (HSP) se acumula (Lurie y col., 1996). Parsell y Linnquist (1993) proponen que las HSP producidas en respuesta a las altas temperaturas previenen la desnaturalización irreversible de las proteínas. Las HSP son producidas dentro de los 30 min posteriores a la exposición a temperaturas en el rango de 34-42°C (Kanabus y col., 1984). El período lag para la inducción de la respuesta al calentamiento térmico es menor respecto de la respuesta a otros tipos de estrés (Trewavas, 1999). Esta respuesta a temperaturas, en general encima de 35°C, es la disociación de poliribosomas y una posterior re-asociación de algunos ribosomas en otros poliribosomas, los cuales traducen el mRNA de las HSP (Ferguson y col., 1994). Estudios con varios organismos han demostrado que la exposición a temperaturas elevadas inducen la termotolerancia, la cual los protege de una segunda exposición a una temperatura menor. Se cree que dicha termotolerancia se debe a una protección de las proteínas contra la desnaturalización irreversible (Ferguson y col., 2000). El desarrollo de la termotolerancia ha sido asociada con la síntesis de las HSP, y la pérdida de la termotolerancia con la desaparición de las HSP (Vierling, 1991).

La masa molecular de las HSP varía entre 16 y 104 kDa (kilodaltons) (Taiz y Zeiger, 1998). Varias de ellas son codificadas por familias de multigenes, algunas de las cuales sólo son inducidas por calentamiento a altas temperaturas. Diferentes HSP se hallan en el núcleo, mitocondria, cloroplasto, retículo endoplasmático y citosol (Taiz y Zeiger, 1998).

El desarrollo de la termotolerancia es dependiente de la temperatura de exposición. La temperatura a usar debe ser suficiente para iniciar la síntesis de las HSP, pero no demasiado alta como para que la transcripción y traducción de las mismas sea inhibida. Se ha encontrado que temperaturas de 35-40°C han sido efectivas, dependiendo del producto (Lurie, 1998b). A 42°C o mayores, la síntesis de las HSP es atenuada y los productos son más tendientes a sufrir daño por calor (Ferguson y col., 1994). Hay varias hipótesis que explican el daño por calentamiento. Varios de los conceptos y la evidencia experimental involucran la desnaturalización y desorganización de la síntesis de proteínas, como así también la pérdida de la integridad de membranas (Paull y Chen, 2000). La

desnaturalización proteica a la temperatura letal es considerada como irreversible, mientras que a menores temperaturas se puede observar una inactivación reversible (Bernstam, 1978). Por lo tanto, es necesario determinar los cambios fisiológicos que son posiblemente reversibles y hallar cuando la desorganización celular excede la habilidad de la célula para reparar y recuperarse (Paull y Chen , 2000).

#### V - 2.4. Tolerancia al daño por frío

La correlación entre las HSP y la termotolerancia ha sido establecida en varios organismos vivos, pero recientemente ha sido hallado que el estrés por calentamiento puede condicionar a las plantas a las bajas temperaturas. Se ha encontrado que una exposición previa de discos de tomate a 38-42°C por unas horas en aire caliente afectó la sensibilidad de los mismos al daño por frío (Saltveit, 1991). Esta resistencia al daño por bajas temperaturas ha sido consistente con la presencia de HSP (Lafuente y col., 1991). En un estudio con discos de palta, una producción máxima de HSP se halló luego de 4h a 38°C y el calentamiento provocó un significativo grado de protección contra el daño por frío (Florissen y col., 1996).

La reducción de la sensibilidad al daño por frío de varios frutos puede no deberse únicamente a la presencia de HSP. El daño por frío está asociado a un daño en membranas y el tratamiento térmico a 35-40°C puede causar alteraciones en la misma. Altas temperaturas (35-40°C) incrementan la pérdida de electrolitos (Lurie y Klein, 1990), pero luego de que el tejido es removido del estrés térmico la pérdida de electrolitos retorna a los niveles hallados a 20°C. Un exámen de la composición de lípidos de la membrana plasmática de manzanas tratadas en aire 4 días a 38°C y luego a 0°C por 4 meses mostró un mayor porcentaje de fosfolípidos y un mayor contenido de ácidos grasos insaturados en frutos tratados respecto de los no tratados (Lurie y col., 1995). Esto se corresponde con la menor pérdida de electrolitos de los frutos preacondicionados.

Si las condiciones del tratamiento apropiadas no son halladas, en cuanto al tiempo-temperaturas requeridos para lograr el efecto buscado, los frutos expuestos pueden sufrir

daño por calentamiento. Estas manifestaciones pueden ser externas o internas, tales como pardeamiento de la piel, punteado, mayor decaimiento, ablandamiento anormal, pardeamiento del tejido interno, entre otros.

## V – 3. ENVASADO EN ATMOSFERA MODIFICADA

### V – 3.1. ¿Qué es?. Usos y beneficios

Los empaques para atmósfera modificada (AM) se definen como “el encierro de productos alimenticios en materiales que constituyan una barrera a los gases, y en los cuales el ambiente gaseoso ha sido cambiado” (Young, y col., 1988). La búsqueda de productos “higiénicamente” frescos y de alta calidad, ha inducido uno de los crecimientos más importantes en el sector de la distribución al por menor de productos refrigerados. Durante las últimas décadas se ha producido, en éste contexto, el rápido crecimiento del desarrollo del empaquetado de alimentos en AM. El empleo de AM para incrementar la vida útil, no es un concepto nuevo en la conservación de alimentos.

El envasado en AM es un proceso dinámico en el que el envase cerrado y el producto envasado interactúan entre si haciendo que la atmósfera interna alcance un equilibrio adecuado.

A diferencia de otros productos perecederos, los vegetales continúan respirando después de ser recolectados, en consecuencia debe tenerse en cuenta esta actividad respiratoria.

El vegetal es un tejido vivo que mantiene su metabolismo activo. Mientras respira, expele agua, produce dióxido de carbono y otros gases y consume oxígeno. Por lo tanto, el mantener los alimentos dentro de un envase resulta en cambios en el microambiente generando de esta manera una atmósfera modificada.

Si las características de respiración del vegetal pueden equilibrarse a la permeabilidad del film empleado para el envase, en su interior, se podrá crear de forma pasiva, una atmósfera modificada favorable (Devlieghere, y col. 2000). De ésta manera se origina un equilibrio dinámico entre la actividad respiratoria del producto embalado y la difusión de los gases a través del film. Este control de la tasa respiratoria, manejado adecuadamente, puede permitir prolongar la vida comercial de un producto hortifrutícola. Las películas también necesitan poseer una cierta permeabilidad al etileno, lo cual previene la acumulación de esta hormona de maduración y prolonga la vida útil del fruto (Kader y col., 1989)

El uso de AM da como resultado una composición atmosférica dentro del envase y alrededor del producto a almacenar diferente a la del aire (78,08% N<sub>2</sub>, 20,95% O<sub>2</sub>, 0,03% CO<sub>2</sub>). Generalmente, esto involucra la reducción del oxígeno y/o la elevación de la concentración de dióxido de carbono.

Las AM de equilibrio, conteniendo 2-5% de O<sub>2</sub> y 3-8% de CO<sub>2</sub>, han mostrado *que* actúan retrasando la maduración y el ablandamiento (Devlieghere, y col. 2000), así como reduciendo la degradación de la clorofila, las podredumbres de origen microbiológico y los pardeamientos enzimáticos (Kader y col. 1989), entre otros. El hecho de modificar y/o manipular la atmósfera que rodea al producto dentro del envase, es una opción poscosecha para disminuir y/o retardar el desarrollo del daño por frío en frutos y vegetales. Este efecto ha sido observado en mango (Pesis y col., 2000), pimiento (Serrano y col., 1997), pepino (Wang y Qi, 1997), papa (Sherman y Ewing, 1983) y zucchini (Mencarelli, 1987) entre otros.

El potencial de beneficio o de daño al usar AM depende de varios factores (Devlieghere, y col. 2000). Entre ellos podemos mencionar:

- el producto a almacenar (esto incluye la variedad empleada, cantidad de producto, velocidad de respiración, etc.)
- la edad fisiológica o estado de madurez
- la composición atmosférica dentro del envase
- la temperatura y duración del almacenamiento

- las características del film plástico empleado (permeabilidad a los gases, velocidad de transmisión del vapor de agua, propiedades mecánicas)
- el área superficial total del envase cerrado
- el volumen vacío dentro del envase

La composición de la atmósfera de almacenamiento influye sobre la vida útil del producto mientras permanece en él. Modificando la concentración de los gases oxígeno y dióxido de carbono se puede prolongar el período de almacenamiento máximo. Es frecuente recurrir a esta técnica como complemento de las bajas temperaturas.

### V - 3.2. Tipos de atmósferas modificadas

Las atmósferas modificadas se pueden crear tanto por el propio producto (Atmósfera Modificada Pasiva, AMP) o intencionalmente (Atmósfera Modificada Activa, AMA).

- **Atmósfera Modificada Pasiva (AMP):** se generan en el interior de un envase herméticamente cerrado como consecuencia de la respiración del producto y la permeabilidad de las películas. Si las características de la respiración están debidamente ajustadas a los valores de permeabilidad del film, se puede crear pasivamente una atmósfera modificada beneficiosa, en el interior del envase, es decir, cuando se establezca un equilibrio entre la intensidad de respiración del producto y transmisión de oxígeno y dióxido de carbono a través del film.
- **Atmósfera Modificada Activa (AMA):** implica la colocación de los productos dentro de un envase permeable a los gases al cual posteriormente se realiza vacío y se reemplaza la atmósfera del interior del envase con una mezcla preestablecida de  $O_2 / CO_2 / N_2$ , resultando así una atmósfera de equilibrio más rápida que por generación de forma pasiva.

La combinación de gases a utilizar depende de muchos factores, como tipo de producto, material de envase y la temperatura de almacenamiento.



### V - 3.3. El envasado mediante películas plásticas

El material de envasado elegido debe ser capaz de mantener constante la mezcla de gases, impidiendo la entrada de oxígeno y la fuga de dióxido de carbono. Además es importante que posea las características de antiniebla y de fácil apertura (Anónimo 2002 b). Con la cualidad del antiniebla se evita que las gotas de agua procedentes de la actividad respiratoria y transpiración del fruto o vegetal se condensen en la superficie interna del envase. El sellado de los envases además de ser resistente e impermeable, deben facilitar la apertura de la bolsa.

El empleo de películas de diferente permeabilidad dará lugar a la formación de atmósfera de equilibrio distintas y por tanto la evolución de los frutos también será diferente. La envoltura individual de los frutos con una película retráctil conforma una segunda lámina externa de protección y una microatmósfera alrededor del fruto. Esta barrera evita la pérdida de humedad, protege frente a la propagación de podredumbres y mejor las condiciones higiénicas en la manipulación.

#### *V - 3.3.1. Tipos de películas*

A continuación se describen en forma resumida los distintos tipos de películas plásticas que se emplean actualmente en el envasado de frutas y hortalizas frescas (Anónimo 2002 b).

- **Películas laminadas:** Estas películas están conformadas por láminas de diferentes materiales plásticos unidas mediante un adhesivo, en forma de sándwich. Suelen emplearse con productos de baja o media actividad respiratoria, ya que las capas interfieren en la movilidad del oxígeno hacia el interior del envase.
- **Películas coextruidas:** Se caracterizan por ser láminas producidas simultáneamente que se unen sin necesidad de adhesivo. Son más económicas que las películas laminadas, sin embargo éstas últimas sellan mejor, pues el polietileno se funde y se

reconstruye de forma más segura. La velocidad de transmisión de oxígeno hacia el interior del envase es mayor que en las películas laminadas.

- **Películas microperforadas:** Se emplean en aquellos productos que precisan de una velocidad de transmisión de oxígeno elevada. Se trata de películas que contienen pequeños agujeros de aproximadamente 40-200 micrones de diámetro que atraviesan la película. La atmósfera dentro del envase es determinada por el área total de perforaciones en la superficie del envase. Las películas microperforadas mantienen unos niveles de humedad relativa altos y son muy efectivas para prolongar la vida media de productos especialmente sensibles a las pérdidas por deshidratación y de deterioro por microorganismos.
- **Membranas microporosas:** La membrana microporosa se emplea en combinación con otras películas flexibles. Se coloca sobre una película impermeable al oxígeno la cual tiene una gran perforación. De esta forma se consigue que todos los intercambios gaseosos se produzcan a través de la membrana microporosa, que tiene unos poros de 0,2-3 micras de diámetro. La velocidad de transmisión de oxígeno se puede variar cambiando su espesor o modificando el número y tamaño de los microporos que conforman la membrana.
- **Películas inteligentes:** Estas películas son capaces de soportar variaciones de la temperatura de almacenamiento de hasta 3-10° C e incrementan la permeabilidad a los gases (velocidad de transmisión de oxígeno) mil veces cuando la temperatura aumenta por encima de la temperatura límite establecida, evitando la aparición de procesos de anaerobiosis.

#### V - 3.4. Selección de las películas

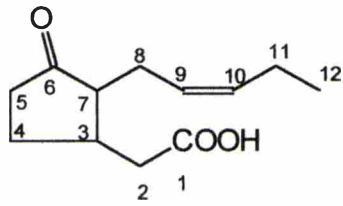
Según Kader y col. (1989), las principales características a considerar cuando se seleccionan los materiales para el envasado en atmósfera modificada de vegetales frescos son:

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

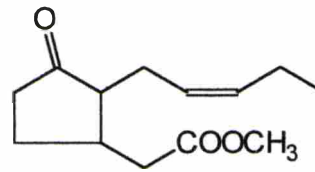
El empleo de películas de polietileno (PE) han sido y son ampliamente usadas en diferentes productos frescos tales como: pepino (Adamicki, 1984; Wang y Qi, 1997), pomelos (Ben-Yehoshua y col., 1981), pimientos (Serrano y col., 1997), tomate (Hobson, 1981, 1987) entre otros.

#### V – 4. TRATAMIENTO CON METIL JASMONATO

El ácido jasmónico (AJ) y su metil ester, más conocido como metil jasmonato (MJ) fueron en principio identificados como compuestos con olor en el aceite esencial de jazmín (Demole, 1962). Estudios posteriores demostraron que los jasmonatos, término que incluye los isómeros del AJ, conjugados con aminoácidos y azúcares, y otros derivados, se hallaban presentes en Angiospermas, Gimnospermas y algas (Parthier, 1991) sugiriendo de que podrían cumplir un rol importante en la fisiología de las plantas. Posee actividad óptica, y por tanto 4 isómeros dado que sus C-3 y C-7 son quirales.



Acido Jasmónico



Metil Jasmonato

#### V - 4.1. Biosíntesis y metabolismo

Los pasos de biosíntesis comienzan en el ácido linolénico y finalizan en el isómero (+)-7-iso-AJ, el cual se transforma fácilmente por isomerización en el (-)-AJ, siendo éste el producto mayoritario y con actividad biológica (Sembdner y Parthier, 1993). Se ha demostrado que en plantas superiores los pasos de biosíntesis ocurren en frutos inmaduros, cotiledones de semillas germinadas y hojas (Vick y Zimmerman, 1984). La localización intracelular de los distintos pasos no está aún totalmente vislumbrada; algunos pasos son catalizados por enzimas ligadas a membranas en cloroplastos (Vick y Zimmerman, 1984).

Las rutas metabólicas detectadas en plantas son: 1) hidroxilación del C-11 y C-12 para generar los derivados 11-OH y 12-OH; 2) Reducción del grupo ceto C-6 resultando en compuestos relacionados con el ácido cucúrbico; 3) O-glucosilación de los metabolitos hidroxilados generando tanto O(11)- o O(12)- glucósidos, o estructuras relacionadas con O(6)-glucósidos del ácido cucúrbico; 4) Conjugación con aminoácidos, (Sembdner y Parthier, 1993).

#### V-4.2. Acción del jasmonato a nivel fisiológico

Aplicaciones externas de jasmonatos sobre las plantas generan diversos efectos, tanto de inhibición como inducción, en cambios morfológicos y fisiológicos (Sembdner y Parthier, 1993). Algunos de ellos parecen ser similares a la actividad del ácido abscísico

(ABA). Varios experimentos fueron hechos con racematos sintéticos de ( $\pm$ )-AJ o su metil ester MJ, siendo este último disponible en la industria de los perfumes. La eficiencia del ácido libre puede diferir de la del metil ester, probablemente dependiendo en la diferencia de consumo por parte de las plantas. El (-)-enantiómero nativo es el compuesto más activo, pero el (+)-MJ es descrito como el más potente también (Yamame y col. 1981). Se ha hallado que inhibe el crecimiento de plantines (Yamame y col. 1980), pero también promueve la senescencia de hojas (Ueda y col., 1981). En general, el AJ es altamente activo en concentraciones medias ( $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M).

La inducción del jasmonato en la promoción de la senescencia de hojas es caracterizada por la degradación de clorofilas, acumulación de  $\beta$ -caroteno, incremento de la respiración celular, y de la actividad proteasa y peroxidasa; como así también la reducción de la actividad fotosintética y un incremento en la maduración de frutos (Sembdner y Parthier, 1993).

Los jasmonatos promueven la producción de etileno en manzanas y tomates (Fan y col., 1997; Saniewski y col, 1987), sin embargo la acumulación de carotenoides puede ser inhibida por etileno (Kang y Burg, 1972) y jasmonatos (Miersch y col., 1986). No está claro como responden los frutos frente a los jasmonatos en la producción y/o acción del etileno.

Ha sido informado que tratamientos con MJ sobre tomates incrementa el ácido linolénico y disminuye el ácido linoléico (Czapski, y col., 1992). La mayor relación entre ácidos linolénico y linoleico en muestras tratadas con MJ ha sido relacionada a una mayor tolerancia al daño por frío. Además, los jasmonatos son similares al ABA en cuanto a sus propiedades fisiológicas y en respuesta al estrés (Parthier, 1991). Ha sido demostrado que el ABA incrementa la tolerancia al daño por frío en varias especies (Wang, 1991), por lo que es posible que los jasmonatos también induzcan una respuesta similar en las plantas en cuanto a aliviar el daño por frío. También, algunas proteínas específicas inducidas por jasmonatos son similares a las inducidas por el tratamiento térmico (Nover, y col., 1989). Como se comentó anteriormente (sección V-2), el tratamiento térmico es altamente efectivo en la disminución del daño por frío. Aplicaciones de MJ en forma de vapor o por inmersión aumentan la resistencia las temperaturas de daño por frío y disminuyen la

incidencia del daño en frutos y vegetales sensibles tales como zucchini (Wang y Buta, 1994), pimientos, palta (Meir y col, 1996), mango (González-Aguilar, y col. 2000) y también extienden el período de vida útil y reducen la contaminación microbiológica de apio y pimiento mínimamente procesados (Buta y Moline, 1998).

## V – OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo fue seleccionar tratamientos poscosecha que retarden la incidencia del daño por frío en berenjenas Money Maker N°2.

## V - MATERIALES Y METODOS

### V-1. Material Vegetal

Las experiencias se llevaron a cabo empleando berenjenas cuya variedad, estado de madurez y procedencia son similares a las descritas en Materiales y Métodos del Capítulo I, sección I-1 (I-MyM: I-1).

### V-2. Tratamientos poscosecha

#### V-2.1. Empleo de atmósfera modificada pasiva (AMP)

##### V-2.1.1. Ensayos de almacenamiento en AMP

###### V-2.1.1.1. Acondicionamiento y almacenamiento de los frutos

Los frutos se dividieron en 4 lotes. Muestras de cada uno de ellos fueron empacados con distintas películas: polietileno de baja densidad (LDPE) perforada, LDPE, PD900 y PD941, siendo estas tres últimas películas sin perforar. Se colocaron 4 berenjenas en una bandeja plástica, se recubrió la misma con la película y se selló con calor. Posteriormente, los frutos empacados se almacenaron a 0° y 10°C por un período máximo de 15 días. Las determinaciones experimentales se efectuaron al inicio y luego de 6, 8 y 15 días de almacenamiento. Se destinaron 2 empaques (de cada tipo de película) para cada temperatura y tiempo analizados.

###### V-2.1.1.2. Películas utilizadas:

Se emplearon 4 tipos de películas para el almacenamiento refrigerado de los frutos. Las mismas fueron:

- *LDPE perforada (polietileno de baja densidad):* a bolsas de 30 × 20 cm de polietileno de baja densidad (LDPE) se le efectuaron 30 agujeros de 5 mm de diámetro (12% del área total), para permitir un intercambio gaseoso fluido.

- **LDPE:** dichas bolsas poseen tamaño comparable a la detallada anteriormente, 55  $\mu\text{m}$  de espesor, permeabilidad al  $\text{O}_2$  3000  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C, permeabilidad al  $\text{CO}_2$  10000  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C y permeabilidad al vapor de agua 12  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C.
- **PD900 (Cryovac®):** las bolsas poseen tamaño comparable a las anteriores, 65  $\mu\text{m}$  de espesor, permeabilidad al  $\text{O}_2$  3000  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C, permeabilidad al  $\text{CO}_2$  9800  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C y permeabilidad al vapor de agua 10,08  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C.
- **PD941 (Cryovac®):** dichas bolsas poseen tamaño comparable a las anteriores, 18  $\mu\text{m}$  de espesor, permeabilidad al  $\text{O}_2$  16500  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C, permeabilidad al  $\text{CO}_2$  30000  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C y permeabilidad al vapor de agua 77,52  $\text{cm}^3/\text{m}^2.24\text{h}$  a 23°C.

#### V-2.1.2. Ensayos con fungicida y almacenamiento en AMP

##### V-2.1.2.1. Acondicionamiento y almacenamiento de los frutos

Los frutos que denominaremos *tratados* se sumergieron durante 2 min en una solución acuosa de procloraz 1000 ppm (según IUPAC: 1-N-propil-N-(2(2,4,6-triclorofenoxi) etil) - carbamol - imidazol; nombre comercial: Sportak (Agrevo)). Luego del tratamiento, los mismos se dejaron secar, se agruparon de a 4 frutos, se los colocó en bandejas, y se los empacó empleando películas LDPE perforadas y sin perforar (LDPE y PD941). Dichas películas se sellaron con calor, se destinaron 2 empaques de cada tipo de película para cada temperatura y tiempo analizados. A los frutos que denominaremos *controles* se los procesó de igual modo que a los tratados, excepto que la inmersión por 2 minutos se efectuó empleando sólo agua.

Se llevaron a cabo 2 experiencias de almacenamiento distintas:



- *Experiencia I:* los frutos controles y tratados contenidos en los empaques con las distintas películas se almacenaron a 0° y 10°C por un período máximo de 14 días. Las determinaciones experimentales se efectuaron al inicio y luego de 2, 5, 8, 12 y 14 días de almacenamiento.
- *Experiencia II:* se almacenaron los frutos controles y tratados contenidos en los empaques con las distintas películas sólo a 10°C de temperatura por un período máximo de 23 días. Las determinaciones experimentales se efectuaron al inicio y luego de 12, 14, 16, 19, 21 y 23 días de almacenamiento. A cada día de muestreo, al menos 1 empaque de cada tipo de película se llevó a 20°C por 48 h.

#### V-2.2. Tratamiento con metil jasmonato y almacenamiento en AMP

Los frutos se lavaron con NaClO (100 ppm Cloro activo) y luego se los dejó secar al aire. El tratamiento con metil jasmonato (MJ) se realizó de 2 maneras. Una de ellas fue en forma de vapor (González-Aguilar, 2000), para lo cual se colocaron de a 2 frutos en jarras (volumen 1 l) que contenían un papel de filtro impregnado con  $10^{-5}$  ó  $10^{-4}$  M de MJ (100%). Se las cerró herméticamente y se las dejó incubando por 12 h a 20°C. Por otro lado, se efectuó el tratamiento por inmersión de los frutos (Buta y Moline, 1998) en una suspensión acuosa de 0,05% Tween-20 y  $10^{-5}$  ó  $10^{-4}$  M de MJ por 3 min. Los frutos control fueron sumergidos sólo en agua destilada.

Luego de los tratamientos, los frutos fueron empacados de a 4 en bandejas plásticas, cubiertos por la película sin perforar PD941 y sellados por calor. Posteriormente fueron almacenados a 0°C por 2, 6, 7 y 9 días. Se destinaron 2 empaques de cada tratamiento para cada tiempo de análisis.

## V-2.3. Tratamiento térmico en aire seco y almacenamiento en AMP

### V-2.3.1. Acondicionamiento y almacenamiento de los frutos

Los frutos se lavaron con NaClO (100 ppm Cloro activo) y luego se los dejó secar al aire. Los frutos que denominaremos *tratados*, se agruparon de a 4 en bandejas plásticas, las que se cubrieron con un film de PVC perforado. Las bandejas así cubiertas se colocaron en estufa a la temperatura y durante el tiempo correspondiente al tratamiento térmico a efectuar. Posteriormente, se retiró la cubierta de PVC y se permitió que los frutos retornaran a temperatura ambiente. Las bandeja se cubrieron con la película PD941 sin perforar (cuyas características fueron detalladas anteriormente), se sellaron por calor y se colocaron a 0°C por un período máximo de 9 días. Las determinaciones experimentales se efectuaron al inicio y luego de 2, 5, 6, 7 y 9 días de almacenamiento. Se destinaron 2 empaques, pertenecientes a cada tratamiento térmico para su análisis a cada día de muestreo. A los frutos que denominaremos *controles* se los procesó de igual modo que a los tratados, excepto que no se les efectuó el tratamiento térmico.

A cada día de muestreo, al menos 1 empaque de cada tratamiento se llevó a 20°C por 48 h.

### V-2.3.2. Tratamiento térmico en aire seco

Las temperaturas y tiempos empleados para dicho tratamiento fueron 37°C durante 5, 15 y 24 h; y 40, 43 y 45°C durante 30 min y 2 h. Todos los tratamientos se efectuaron en estufa de temperatura controlada.

### **V-3. Determinaciones efectuadas**

#### *V-3.1. Observaciones sensoriales de los frutos*

A cada día de muestreo, se evaluaron visualmente los síntomas de daño por frío en la pulpa y piel de las berenjenas. Se evaluaron según lo indicado en I-MyM: I-2.

#### *V-3.2. Pardeamiento de la pulpa*

El valor de  $L_0$  se determinó según se describió en I-MyM: I-4.

#### *V-3.3. Pérdida de electrolitos por parte del tejido*

A cada día de muestreo se evaluó la pérdida de electrolitos de la pulpa de frutos. La determinación y expresión de resultados se llevó a cabo de igual forma a la descrita en I-MyM: I-6.

#### *V-3.4. Pérdida de peso*

Al inicio y luego de cada período de almacenamiento correspondiente a cada temperatura, se procedió al pesado de cada empaque conteniendo los frutos. Se calculó la pérdida de peso porcentual con respecto al peso inicial.

#### *V-3.5. Contenido de etileno interno*

Se analizó el contenido de etileno interno por extracción de una muestra gaseosa del interior del fruto como se detalló en II-MyM: II-4.

### V-3.6. Composición de la atmósfera dentro de los empaques

Para la determinación del contenido de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y etileno presente en cada empaque, se extrajo 1 ml de la atmósfera que rodeaba los frutos y se cuantificó por CG. Para tal fin se empleó, en el caso de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, un CG Shimadzu Serie GC-6A (Kyoto, Japón), mientras que para etileno se utilizó un CG Varian Star Serie 3400 CX (Walnut Creek, California, USA). Las condiciones de corrida se detallan en la tabla V-1.

Tabla V-1: Condiciones de corrida para la determinación del contenido de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y etileno por CG.

	CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>	ETILENO
<i>Columna</i>	Alltech - CTR I	Porapack N
- temperatura	30°C	100°C
- gas portador	He	He
- caudal	40 ml min <sup>-1</sup>	30 ml min <sup>-1</sup>
<i>Inyector</i>		
- temperatura	130°C	120°C
<i>Detector</i>	Conductividad térmica (TCD)	Ionización de llama (FID)
- temperatura	130°C	120°C

Los valores de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se expresaron como contenido porcentual y los niveles de etileno en ppm. Para cada determinación se emplearon al menos dos empaques perteneciente a cada tiempo y temperatura de ensayo.

### V-3.7. Medida de textura

Se midió la firmeza del fruto utilizando un texturómetro TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems (SMS), Inglaterra). Los frutos se cortaron longitudinalmente, se les extrajo un trozo de piel de la región ecuatorial de cada mitad del fruto y en esa zona se efectuó la determinación. Se empleó una celda de carga de 25 kg con un cilindro de prueba de extremo plano, de 3 mm de diámetro y a una velocidad de deformación de 1 mm.s<sup>-1</sup>. Se

registró la fuerza necesaria para penetrar el tejido hasta una profundidad de 8 mm. Los datos se expresaron en  $N.mm^{-1}$  calculada como la pendiente de la curva fuerza vs mm penetrados luego de que el cilindro de prueba penetrara 2 mm. Para cada condición de ensayo analizada se emplearon al menos 2 frutos, y se realizaron 3 determinaciones en cada mitad.

### V-3.8. Medida de la permeabilidad de las películas

Se midió la permeabilidad al  $O_2$  y  $CO_2$  de las películas LDPE, PD900 y PD941 a la temperatura de 0 y  $10^{\circ}C$  por el método de acumulación en una celda de acero inoxidable especialmente diseñada (fig. V-1). La celda cilíndrica estaba dividida en dos compartimentos por la película a ensayar. Cada compartimento poseía un tubo de salida y entrada de gas, y un tubo con séptum por donde tomar la muestra gaseosa. El volumen de cada compartimento era de  $29,45\text{ cm}^3$  y el área de transferencia era  $4,91\text{ cm}^2$ . El método cuasi-isostático usado estuvo basado en la medida de la cantidad de gas que difunde a través de una muestra de la película o film bajo condiciones en las cuales la diferencia de presión total a través del material era cero. (Mc Hugh y Krochta, 1994). Los porcentajes de  $O_2$  y  $CO_2$  fueron determinados como se indicó en V-MyM: V-3.6 y los cálculos se efectuaron según García y col. (1999).

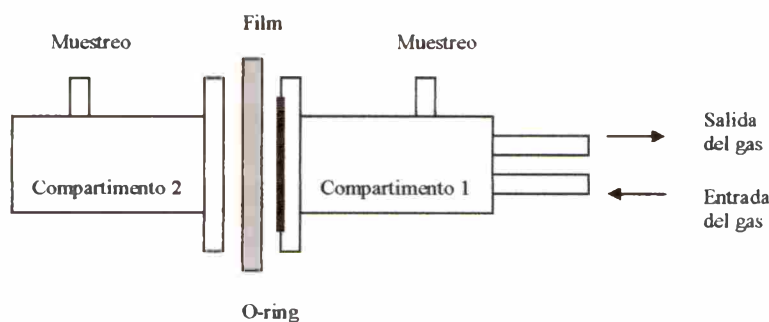


Figura V-1: Diagrama de la celda de medida de permeabilidad de gases

### *V-3.9. Extracción enzimática*

Se obtuvieron extractos crudos a partir de tejido congelado de berenjena como se detalló en IV-MyM: IV-4. En esta oportunidad, la extracción se llevó a cabo empleando un buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, pH 7) conteniendo NaCl 1 M, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, PVPP 3 %p/v y Tritón X-100 0,1 %v/v según sugerencias de Anderson y col. (1995) y Civello y col. (1995).

### *V-3.10. Medida de la actividad enzimática de PPO*

La actividad PPO se determinó conforme a lo detallado en IV-MyM: IV:5.

### *V-3.11. Medida de la actividad enzimática de POD*

La actividad peroxidasa (POD) se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a 430 nm y a 25°C. La mezcla de reacción contenía pirogalol 9mM en buffer fosfato-Na 0,1 M pH 7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  4mM, 0,1 ml de extracto enzimático total y se completó el volumen final de 0,5 ml con buffer fosfato-Na 0,1 M de pH 7. La actividad enzimática se calculó como la pendiente de la porción lineal de la curva absorbancia-tiempo. Se efectuaron medidas de la actividad por cuatuplicado.

### *V-3.12. Determinación del contenido de proteínas*

El contenido proteico de cada extracto se determinó por el método de Bradford como se detalló en IV-MyM: IV:6.

*V-3.13. Análisis estadístico.*

Se empleó un diseño factorial y los resultados fueron analizados utilizando el software SYSTAT para efectuar el test LSD con una significancia de 0,05.

## V - RESULTADOS

### V – I. ALMACENAMIENTO EN AMP

#### V-1.1. Ensayos de almacenamiento en AMP

##### V-1.1.1. Determinación de la permeabilidad al CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> a 0° y 10°C

La velocidad de permeación de los gases varía con la temperatura, por ello se la determinó a 0 y 10°C. En la tabla V-2 se muestran las permeabilidades al CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> de las películas LDPE, PD900 y PD941 observadas a dichas temperaturas de almacenamiento.

La evaluación de las permeabilidades al CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) medidas a las temperaturas de almacenamiento demostró que las películas LDPE y PD900 presentaron pequeñas diferencias entre sí ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la película PD941 fue la de mayor  $P_{CO_2}$ , y obtuvo prácticamente el doble de  $P_{CO_2}$  respecto de LDPE, a ambas temperaturas. También se observó que la relación de valores de permeabilidad al CO<sub>2</sub> a ambas temperaturas ( $P_{10°C}/P_{0°C}$ ) fue de 1,48 para LDPE y PD900 y de 1,60 para PD941.

**Tabla V-2:** Valores de permeabilidad al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de las distintas películas empleadas, medidos a las temperaturas de almacenamiento (0° y 10°C).

Película	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Permeabilidad CO <sub>2</sub>			Permeabilidad O <sub>2</sub>			Relación $P_{CO_2}/P_{O_2}$	
		$\times 10^{12}$ (cm <sup>3</sup> .m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> .Pa <sup>-1</sup> ) 0°C	10°C	Relación $P_{10°}/P_0$	$\times 10^{12}$ (cm <sup>3</sup> .m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> .Pa <sup>-1</sup> ) 0°C	10°C	Relación $P_{10°}/P_0$	0°C	10°C
LDPE	55	60,62	89,57	1,48	26,73	31,67	1,18	2,27	2,83
PD900	65	71,64	105,86	1,48	21,38	24,59	1,15	3,35	4,31
PD941	18	109,56	174,41	1,60	22,20	25,76	1,16	4,94	6,77
		LSD = 4,20			LSD = 2,50				



Los valores de permeabilidad al O<sub>2</sub> (P<sub>O<sub>2</sub></sub>) hallados a 0° y 10°C fueron similares (p>0,05) para las películas PD900 y PD941, mientras que la P<sub>O<sub>2</sub></sub> fue 1,2 veces mayor (p<0,05) para la película LDPE. La relación de P<sub>O<sub>2</sub></sub> a ambas temperaturas de ensayo (P<sub>10°C</sub>/P<sub>0°C</sub>) fue menor a 1,2 para todas las películas.

La diferencia de P<sub>CO<sub>2</sub></sub> entre películas fue mucho más notoria que la diferencia en los valores de P<sub>O<sub>2</sub></sub>, como lo demuestra la relación P<sub>CO<sub>2</sub></sub>/P<sub>O<sub>2</sub></sub>, siendo esta diferencia más marcada a 10°C que a 0°C. La película PD941 fue la que mostró mayor diferencia entre ambas permeabilidades.

#### *V-1.1.2. Cambios en la composición de la atmósfera dentro del empaquetamiento*

Los resultados hallados para frutos empacados con las distintas películas empleadas para lograr la atmósfera modificada pasiva se muestran en la figura V-2.

La composición de la atmósfera de los empaques con distintas películas varió rápidamente hasta los 2 días y luego permaneció constante (p>0,05). A 10°C se hallaron en la atmósfera de las películas LDPE, PD900 y PD941 valores de O<sub>2</sub> cercanos a 19,0, 16,0 y 16,2%, respectivamente. Mientras que los niveles de CO<sub>2</sub> alcanzados fueron aproximadamente 2,0, 2,0 y 1,2% en LDPE, PD900 y PD941, respectivamente.

Durante el almacenamiento a 0°C, la composición de la atmósfera también varió rápidamente hasta los 2 días y luego permaneció prácticamente estable durante todo el tiempo de análisis (p>0,05). Es así que la composición de la atmósfera fue cercana a 18,0, 14,1 y 15,3% de O<sub>2</sub> y 3,0, 3,2 y 1,8% de CO<sub>2</sub> en LDPE, PD900 y PD941, respectivamente.

Los niveles de etileno nunca superaron las 0,5 y 0,3 ppm a lo largo del almacenamiento a 10 y 0°C, respectivamente.

A ambas temperaturas, se observó una correspondencia entre los valores de porcentajes de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> con las P<sub>CO<sub>2</sub></sub> y P<sub>O<sub>2</sub></sub> respectivas, para cada una de las películas (sección V-1.1.1). Así como hubo similitud entre los valores de P<sub>CO<sub>2</sub></sub> de las películas LDPE

y PD900 fue también comparable el contenido de CO<sub>2</sub>. También la similitud de P<sub>O<sub>2</sub></sub> entre PD900 y PD941 se vio reflejada en un contenido similar de O<sub>2</sub>.

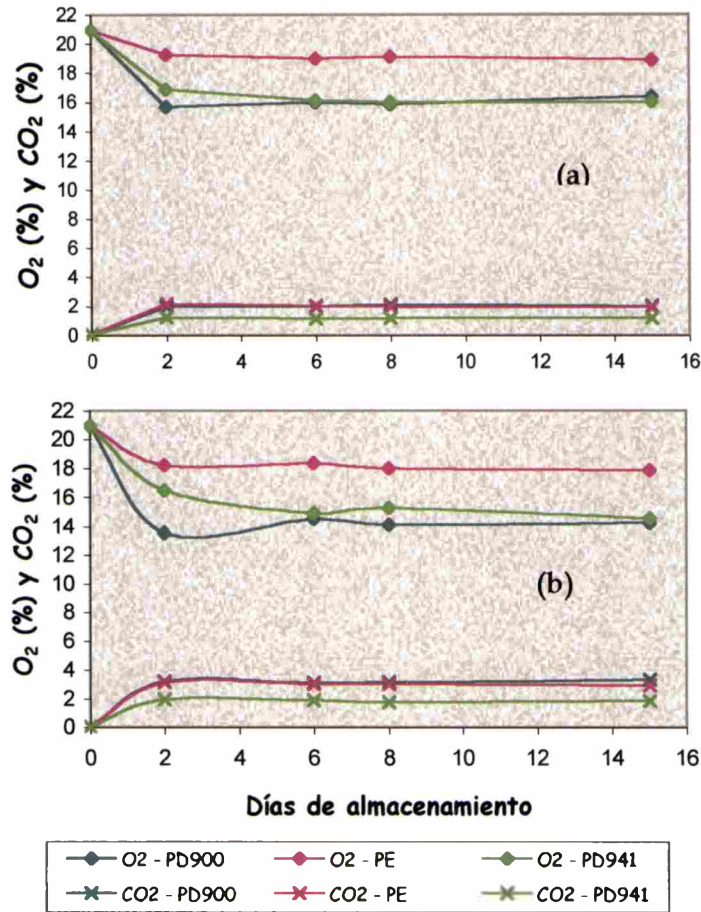


Figura V-2: Composición de la atmósfera que rodea a los frutos dentro de las distintas películas empleadas para el almacenamiento a 10°C (a) y 0°C (b). LSD<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,61; LSD<sub>O<sub>2</sub></sub> = 2,26

### V-1.1.3. Evolución de la pérdida de peso

En la figura V-3, se muestra la pérdida de peso de los frutos empacados con las películas LDPE perforada y PD941.

Los frutos almacenados a 10°C (fig. V-3) y empacados en LDPE perforada mostraron un aumento progresivo de pérdida de peso hasta alcanzar aproximadamente un 2,0% al final del almacenamiento. Mientras que los frutos empacados con la película no perforada PD941 no superaron el 0,60% de pérdida de peso al final del almacenamiento. Idénticos resultados se obtuvieron en frutos empacados en PD900 y LDPE (datos no mostrados). La mayor deshidratación sufrida por frutos almacenados en LDPE perforada respecto de aquellos almacenados en PD941 luego de 15 días de almacenamiento se ve reflejada en la figura V-4.

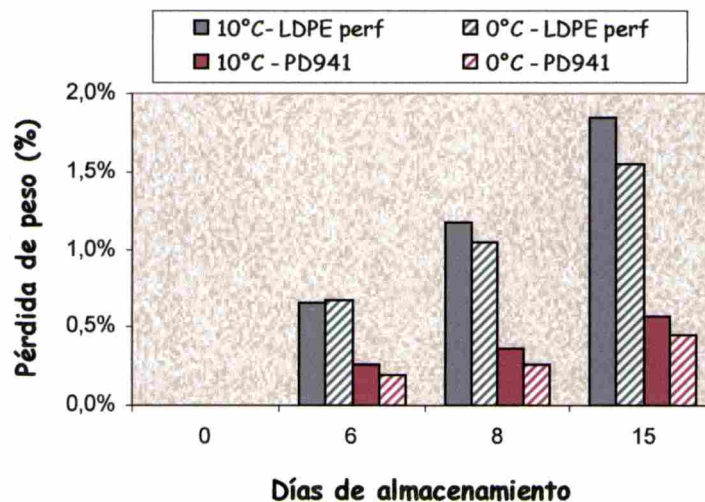


Figura V-3: Evolución de la pérdida de peso de frutos almacenados con películas LDPE perforada y PD941 a 10°C y 0°C. LSD = 0,23

Durante el almacenamiento a 0°C (fig. V-3), también se observó un aumento progresivo de la pérdida de peso con el tiempo de almacenamiento en los frutos empacados en las distintas películas. El mayor porcentaje de pérdida de peso fue observado en frutos empacados con LDPE perforada respecto de aquellos empacados con la película no perforada PD941. La pérdida de peso de los primeros, al final del

almacenamiento, fue cercana al 1,5% y los frutos empacados con la película PD941 presentaron valores que no superaron el 0,5%. Resultados similares se observaron para los frutos empacados con PD900 y LDPE (datos no mostrados).



Figura V-4: Frutos almacenados con la película LDPE perforada (izq.) y PD941 (der.) luego de 15 días a 10°C.

#### *V-1.1.4. Evolución del daño por frío*

Como ya se ha mencionado en I-R: I-2 los frutos almacenados a 10°C no sufrieron daño por frío. En esta oportunidad el empleo de una atmósfera modificada otorgada por el empaquetamiento con las películas sin perforar LDPE, PD900 y PD941 contribuyó a una mayor calidad de los frutos al finalizar el almacenamiento. Los mismos no estaban deshidratados, a diferencia de aquellos almacenados en LDPE perforada. En los empaques no perforados se observó condensación de vapor de agua en forma de niebla sobre las paredes internas de la película. Luego de 12 días de almacenamiento hubo un ligero desarrollo de hongos en el extremo inferior del cáliz, con aspecto seco, no filamentoso y sin penetración en el tejido del fruto. Según informaron Temkin-Gorodeiski y col. (1993),

este tipo de decaimiento producido sobre un cáliz seco o parcialmente seco se debería a la incidencia de *Botrytis cinerea* y no de *Alternaria alternata*.

Durante el almacenamiento a 0°C hubo una evolución diferente del daño por frío en los frutos empacados con las distintas películas. Como se muestra en la figura V-5, los ID de frutos empacados con LDPE perforada y PD900 fueron similares entre sí ( $p>0,05$ ). Los ID de frutos empacados con LDPE y PD941 también presentaron valores de ID similares entre sí, aunque menores que los anteriores. Estos resultados indican un retardo en la evolución del daño por frío cuando se usaron empaques con las películas LDPE y PD941.

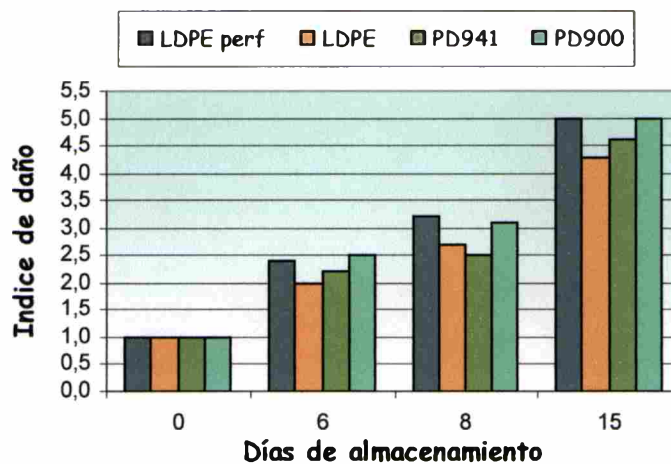


Figura V-5: Evolución del índice de daño por frío en berenjenas almacenadas a 0°C empleando las películas indicadas. LSD = 0,14

Los síntomas de daño por frío observados en frutos almacenados a 0°C en empaques con películas LDPE y PD941 fueron, luego de 6 días, pérdida de brillo superficial y desarrollo de un bajo porcentaje de semillas pardeadas (ID 2,0 y 2,2, respectivamente). Los frutos empacados en LDPE perforada y PD900 presentaron, además, desarrollo leve tanto de punteado superficial como de escaldaduras en la piel debajo del cáliz (ID 2,4 y 2,5, respectivamente). Luego de 8 días de almacenamiento, los frutos empacados en LDPE perforada y PD900 presentaron desarrollo de pardeamiento en la pulpa (ID 3,2), a diferencia de los frutos almacenados en LDPE y PD941 que sólo sumaron leve desarrollo tanto de punteado como de escaldaduras en la piel debajo del cáliz (ID 2,7 y 2,5, respectivamente). Finalmente, a los 15 días de almacenamiento las

diferencias mencionadas en los síntomas de daño por frío entre los frutos empacados con las distintas películas habían desaparecido y todos los frutos presentaban un desarrollo alto de daño por frío.

Los valores de ID aumentaron linealmente con el tiempo de almacenamiento. Los frutos empacados con las películas LDPE perforada y PD900 mostraron una velocidad de incremento de ID de 0,265 ( $r=0,999$ ) y 0,264 ( $r=0,999$ ), respectivamente. Mientras que el valor mostrado por los frutos empacados en PD941 fue de 0,225 ( $r=0,995$ ) y de 0,213 ( $r=0,997$ ) en LDPE. Por lo tanto, se deduce que los frutos almacenados con las películas PD941 y LDPE tuvieron un retardo del daño por frío del 15 y 20%, respectivamente.

En los empaquetamientos con LDPE y PD941 se observó condensación de vapor de agua en forma de niebla sobre las paredes internas de las películas. Mientras que, cuando se empleó PD900 se formaron gotas grandes, y no niebla, provocando la caída de las mismas sobre los frutos. También cabe destacarse que luego de 8 días de almacenamiento a 0°C, el empaquetado de los frutos con películas no perforadas provocó un desarrollo incipiente de hongos en los extremos inferiores del cáliz, siendo más notorio en frutos empacados con PD900. Este desarrollo fúngico se vio ligeramente intensificado luego de 15 días de almacenamiento y la apariencia del mismo fue similar a la mencionada para el almacenamiento a 10°C.

#### *V-1.1.5. Evolución del pardeamiento de la pulpa*

El valor de  $L_0$  medido en la pulpa del fruto es una medida objetiva de la evolución del pardeamiento del tejido. Al inicio del almacenamiento, el valor 88,74 denotó un tejido blancuzco y semillas de color claro.

Dicho valor no sufrió, prácticamente, variaciones durante el almacenamiento a 10°C de frutos empacados con LDPE perforado y aquellas películas no perforadas: LDPE, PD900 y PD941 (datos no mostrados).

A 0°C los valores de  $L_0$  de todos los frutos disminuyeron notablemente ( $p < 0,05$ ) con el tiempo de almacenamiento (fig. V-6), denotando un oscurecimiento de la pulpa de los frutos. Sin embargo, luego de 6 y 8 días de almacenamiento se observó una menor disminución de los valores de  $L_0$  de los frutos empacados con LDPE y PD941 respecto de los correspondientes a los frutos empacados con LDPE perforada y PD900. Los valores de  $L_0$  de los primeros disminuyeron aproximadamente 6 y 14% luego de 6 y 8 días, respectivamente; mientras que la disminución de los segundos, a iguales tiempos, fue de aproximadamente 10 y 17%, respectivamente. A los 15 días de almacenamiento a esta temperatura, los valores de  $L_0$  no mostraron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los frutos empacados con las distintas películas y la disminución fue cercana al 25%.

Estos resultados indican que el empleo de AMP, sólo logró retardar el desarrollo del pardeamiento cuando los frutos fueron empacados con LDPE y PD941.

Finalmente, se decidió utilizar alguna de estas 2 películas que retardaron el daño por frío. Se eligió emplear en futuros ensayos la película PD941 debido a que era menos opaca y poseía menor tendencia a la formación de niebla que la película LDPE.

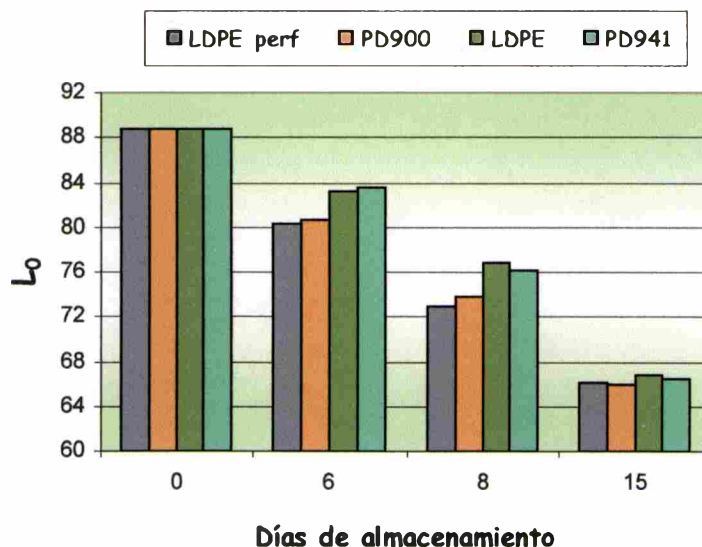


Figura V-6: Evolución de  $L_0$  en frutos almacenados a 0°C en función del tiempo de almacenamiento para las películas indicadas. LSD = 0,40

### V-1.1.6. Evolución de la pérdida de electrolitos

La pérdida de electrolitos del tejido de los frutos se empleó como una medida indirecta del daño de membranas (Murata, y col., 1989) y en consecuencia, contribuyó a determinar el avance del daño por frío.

Como se indicó en la sección anterior, la película PD941 fue la seleccionada para las experiencias a realizar con AMP. En la figura V-7 se muestra la pérdida de electrolitos a ambas temperaturas de almacenamiento de frutos empacados tanto con la película LDPE perforada como con PD941.

Se encontró una diferencia marcada en la pérdida de electrolitos entre ambas temperaturas de almacenamiento. En los frutos almacenados a 10°C, independientemente de la película empleada, se observaron valores prácticamente constantes y similares al valor inicial durante todo el período de almacenamiento ( $p > 0,05$ ). En cambio, la pérdida de electrolitos de frutos almacenados a 0°C, con ambas películas, fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) luego de 6 días. El aumento continuó paulatinamente hasta lograr aproximadamente 4,5 veces el valor inicial luego de 12 días y luego permaneció constante. A esta temperatura de ensayo, tampoco se hallaron diferencias significativas entre frutos empacados en ambas películas ( $p > 0,05$ ).

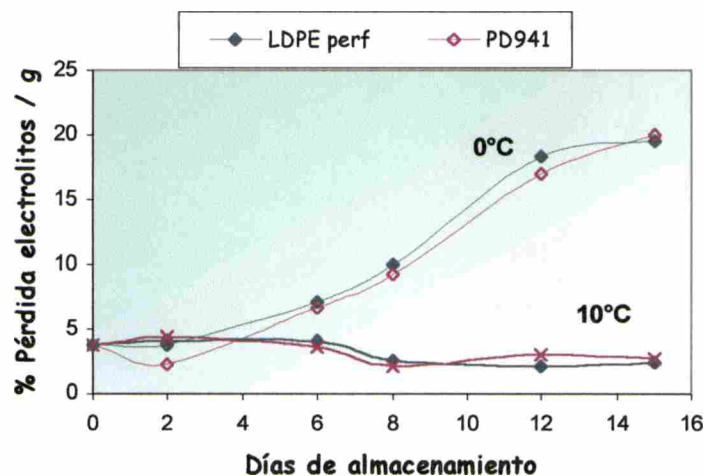


Figura V-7: Pérdida de electrolitos de tejido fresco de frutos almacenados a 10° y 0°C con las películas LDPE perforada y PD941. LSD = 0,48



## V-1.2. Ensayos con fungicida y almacenamiento en AMP

Esta combinación de tratamientos tiende a hallar una alternativa viable para disminuir o inhibir el desarrollo de hongos sobre frutos almacenados, sumado al logro de mayor calidad final y retardo del daño por frío alcanzado usando sólo AMP (sección V-1.1). En este tratamiento poscosecha se combinó el tratamiento con fungicida (procloraz) por inmersión total del fruto y posterior empacado con las películas LDPE perforada, LDPE y PD941 no perforadas.

### *V-1.2.1. Experiencia I: Frutos tratados con procloraz y almacenados a 0° y 10°C por 14 días en AMP.*

Los resultados obtenidos para los frutos control (no tratados con procloraz) fueron similares a los mostrados en la sección anterior (V-1.1).

Los frutos tratados con la solución de procloraz (1000 ppm) mostraron una efectiva inhibición del desarrollo fúngico en el cáliz cuando fueron empacados con las películas no perforadas LDPE y PD941 a ambas temperaturas. Esto tuvo un efecto positivo en cuanto a mejorar la apariencia del cáliz, pero no causó variación en la evolución de los síntomas de daño por frío de los frutos almacenados a 0°C. Tampoco causó efecto sobre la pérdida de peso y la composición de la atmósfera que rodeaba a los frutos (datos no mostrados).

### *V-1.2.2. Experiencia II: Frutos tratados y almacenados a 10°C durante 23 días en AMP.*

Esta experiencia se realizó con el fin de observar si el uso de procloraz era efectivo a mayores tiempos de almacenamiento. El tratamiento con procloraz 1000 ppm logró evitar el desarrollo fúngico en el cáliz de los frutos (decaimiento) hasta el día 23 de almacenamiento a 10°C (tabla V-3, fig. V-8 y V-9) y durante el posterior traslado a 20°C por 48 h en todas las películas analizadas (tabla V-3).

Los frutos empacados con las películas sin perforar (PD941 y LDPE) mostraron una menor deshidratación del cáliz y pérdida de peso ( $p < 0,05$ ), incluso frente al pasaje a 20°C, respecto de los frutos empacados en LDPE perforada (tabla V-3 y fig. V-8 y V-9). También, los frutos control mostraron un desarrollo fúngico con apariencia húmeda, debida tal vez a la mayor HR dentro del empaque.

Los frutos empacados con LDPE perforada sufrieron una elevada pérdida de la calidad siendo ésta evidente por la gran deshidratación del cáliz y del fruto todo (tabla V-3 y fig. V-8 y V-9). El desarrollo fúngico en frutos control tuvo una apariencia seca.

La composición de la atmósfera (tabla V-3) que rodeaba tanto a los frutos control como tratados en los empaques con películas no perforadas presentó valores menores de CO<sub>2</sub> y mayores de O<sub>2</sub> a la salida de cámara respecto de los hallados en la experiencia I y sección V-1.1. Estas diferencias no causaron variaciones apreciables en la conservación de los frutos. Es de interés resaltar que los frutos controles y que fueron transferidos a 20°C (Tabla V-3) mostraron un mayor contenido de CO<sub>2</sub> y menor de O<sub>2</sub> respecto de aquellos frutos tratados con fungicida ( $p < 0,05$ ). Probablemente, esto se deba a la presencia de hongos en el cáliz de los frutos.

**Tabla V-3:** Influencia del tratamiento con procloraz 1000 ppm sobre la calidad de los frutos (decaimiento, deshidratación del cáliz y pérdida de peso) y composición de la atmósfera (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) interior de los empaques utilizando las distintas películas. Resultados correspondientes a 23 días de almacenamiento a 10°C y 48 h adicionales a 20°C.

	Decaimiento <sup>a</sup>		Deshid. cáliz		Pérdida peso		CO <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>	
	(%)		(%)		(%)		(%)		(%)	
	SC <sup>b</sup>	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C
<i>(A) - Control</i>										
LDPE perf	35	50	100	100	7,2	8,1	0,03	0,03	21,0	21,0
LDPE	50	70	70	80	0,7	0,9	1,4	3,2	19,6	16,6
PD941	50	65	75	80	1,6	1,8	1,4	2,7	17,7	15,8
<i>(B) - Tratados</i>										
LDPE perf	ND <sup>c</sup>	ND	100	100	6,0	7,1	0,03	0,03	21,0	21,0
LDPE	ND	ND	25	40	0,4	0,5	0,4	1,4	20,4	18,7
PD941	ND	ND	25	30	1,3	1,4	1,3	2,5	19,2	17,9
	LSD = 5		LSD = 5		LSD = 0,2		LSD = 0,5		LSD = 1,6	

<sup>a</sup> Decaimiento expresado como % de desarrollo fúngico

<sup>b</sup> SC = Salida de Cámara

<sup>c</sup> ND = No Detectable



Figura V-8: Frutos tratados con procloraz (izq) y controles (der) almacenados con la película PD941 durante 23 días a 10°C.



Figura V-9: Frutos tratados con procloraz (izq) y control (der) almacenados con la película LDPE perf. por 23 días a 10°C.

### V-1.3. Discusión

El empaqueo de frutos y vegetales con películas no perforadas ofrece protección física, fisiológica y también contra el deterioro por patógenos durante el período de comercialización (Hardenburg, 1971). Otros beneficios del empaqueo con películas no perforadas incluyen la reducción de la pérdida de humedad y la modificación de la atmósfera dentro del empaque. Por lo tanto, el empaqueo con películas se emplea como complemento del almacenamiento refrigerado para extender el período de vida útil de frutos y vegetales (Hardenburg, 1971). Existen en el mercado varios tipos de películas, con distintos valores de permeabilidad a los gases.

Las permeabilidades a 0 y 10°C de las películas empleadas en este trabajo de Tesis, mostraron que la película PD941 fue tanto la de mayor  $P_{CO_2}$  como la de mayor relación  $P_{CO_2}/P_{O_2}$ , logrando así el menor contenido de  $CO_2$  durante el almacenamiento de los frutos. La mayor  $P_{O_2}$  se observó en la película LDPE y ésta obtuvo el mayor contenido de  $O_2$  durante el almacenamiento de los frutos. Al comparar la composición de la atmósfera que rodeó a los frutos empacados con las distintas películas, el contenido de  $CO_2$  no superó el 3,5% y el de  $O_2$  no disminuyó por debajo del 14,0%.

Las determinaciones de pérdida de peso reflejaron una menor deshidratación en los frutos empacados con películas no perforadas manteniendo así su calidad por un tiempo mayor. Similares resultados fueron hallados por Wang y Qi (1997) trabajando en pepino.

Los primeros síntomas de daño por frío sufridos por los frutos expuestos a 0°C en las distintas películas empleadas se manifestaron con distinta intensidad. Aquellos frutos empacados en LDPE perforada y PD900 tuvieron una velocidad de incremento del valor de ID de 0,265 y 0,264, respectivamente. Mientras que, los frutos empacados en PD941 y LDPE mostraron velocidades de 0,225 y 0,213, respectivamente, demostrando así que el retardo de los síntomas de daño por frío constituyó un 15% cuando se empleó la película PD941 y un 20% para el caso de LDPE. Tanto los valores de ID como de  $L_0$  mostraron las diferencias en el daño por frío al comparar las películas LDPE perforada y PD900 con las

películas PD941 y LDPE, y entre temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, los resultados de la pérdida de electrolitos sólo mostraron la diferencia entre las temperaturas de almacenamiento. Otros autores también lograron retardar el desarrollo del daño por frío empleando AMP para almacenar pimientos verde-maduros (Serrano y col., 1997), pepinos (Wang y Qi, 1997), mango (Pesis y col., 2000) y berenjenas Black Nite (Rodríguez y col. 2001).

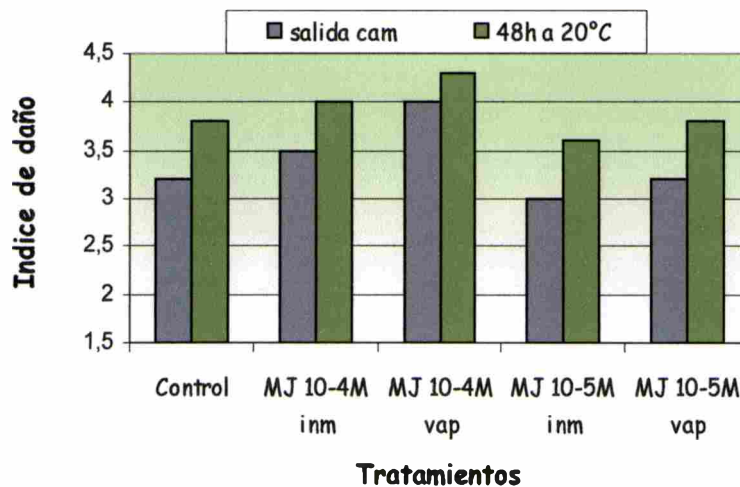
Durante el almacenamiento de berenjenas Money Maker N°2 con las distintas películas no perforadas (AMP) se observó desarrollo de hongos sobre el cáliz. Esto logró eliminarse con el empleo del tratamiento con el fungicida procloraz, ya que se inhibió dicho desarrollo durante 14 días a 0°C y 23 días a 10°C. Este tratamiento permitió un mejoramiento adicional de la calidad de los frutos sumado al hallado empleando sólo AMP. El fungicida procloraz, también fue empleado con éxito por Li y Yu (2000) sobre duraznos almacenados 12 días a 23°C; y también por Temkin-Gorodeiski y col (1993) en otra variedad de berenjenas. Si bien ha sido informado que tratamientos con el fungicida tiobendazol a temperatura ambiente, previo al almacenamiento refrigerado, redujeron el daño por frío en pomelo (Schiffman-Nadel y col., 1972, 1975; Schirra y col., 2000), en nuestro caso el tratamiento con procloraz no obtuvo un retardo adicional de los síntomas del daño por frío respecto de los frutos no tratados.

## V-2. TRATAMIENTO CON METIL JASMONATO Y ALMACENAMIENTO EN AMP

Para efectuar el tratamiento con metil jasmonato (MJ) se trabajó bajo las modalidades de inmersión y vapor. Luego del tratamiento se empaquetaron los frutos con la película no perforada PD941 para finalmente ser almacenados a 0°C. Con este tratamiento poscosecha se intentó retardar aún más el desarrollo del daño por frío.

### V-2.1. Selección del tipo de tratamiento y concentración de MJ

El efecto causado por el tratamiento con MJ sobre los frutos, previo al empacado en AMP, se evaluó a través del ID. En la figura V-10 se muestran los valores alcanzados por los frutos sin tratar o controles y aquellos sometidos a los distintos tratamientos luego de 7 días de almacenamiento a 0°C y 48 h posteriores a 20°C. Los frutos tratados por inmersión y vapor con MJ 10<sup>-4</sup>M presentaron mayores valores de ID que el control ( $p < 0,05$ ) tanto a la salida de cámara como luego del pasaje a 20°C durante 48 h. Esto indicó que los tratamientos no retardaron el daño por frío, sino que por el contrario incrementaron los síntomas. Los frutos tratados con vapor de MJ 10<sup>-5</sup>M mostraron valores de ID comparables al control ( $p > 0,05$ ), mientras que los tratados por inmersión con MJ de igual concentración presentaron valores de ID ligeramente menores que el control tanto a la salida de cámara como luego del pasaje a 20°C por 48 h ( $p < 0,05$ ).



**Figura V-10:** Influencia de los distintos tratamientos con MJ y posterior empacado en AMP con la película PD941 sobre el índice de daño (ID) de frutos almacenados durante 7 días a 0°C a la salida de cámara y luego del pasaje a 20°C por 48 h adicionales. LSD = 0,11

Los valores de  $L_0$  representados en la figura V-11 para los mismos tratamientos, muestran que el almacenamiento de los frutos causó, en todos los casos, pardeamiento de semillas y pulpa, dado que los valores de  $L_0$  son sensiblemente menores al valor registrado al inicio del almacenamiento. Los frutos tratados con MJ 10<sup>-4</sup>M mostraron valores menores

de  $L_0$  que el control ( $p < 0,05$ ) tanto a la salida de cámara como luego del pasaje a  $20^\circ\text{C}$  por 48 h, indicando así un mayor pardeamiento. Los valores de  $L_0$  correspondientes a las berenjenas tratadas con vapor de MJ  $10^{-5}\text{M}$  fueron comparables al control ( $p > 0,05$ ), mientras que los frutos tratados por inmersión en una solución de MJ  $10^{-5}\text{M}$  mostraron valores de  $L_0$  ligeramente mayores ( $p < 0,05$ ).

Por lo dicho se seleccionó el tratamiento con MJ  $10^{-5}\text{M}$  por inmersión.

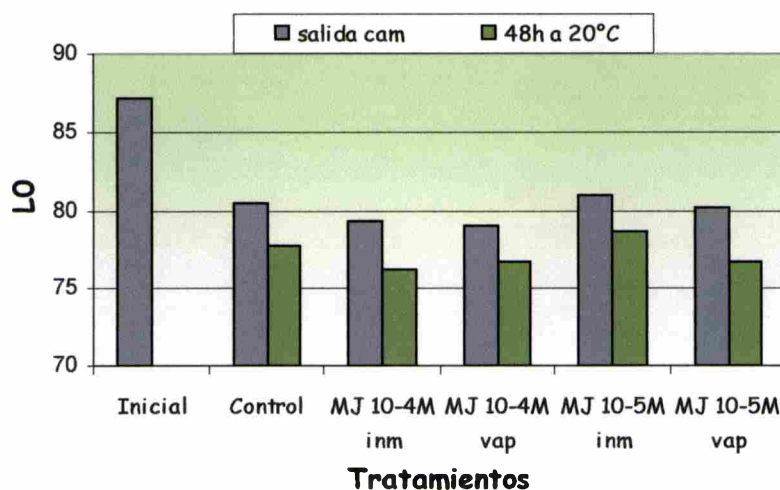


Figura V-11: Influencia de los distintos tratamientos con MJ y posterior empacado en AMP sobre el valor de  $L_0$  de frutos almacenados durante 7 días a  $0^\circ\text{C}$  a la salida de cámara y luego del pasaje a  $20^\circ\text{C}$  por 48 h adicionales. LSD = 0,33

### V-2.2. Efecto del tratamiento con MJ y posterior almacenamiento en AMP a bajas temperaturas

El desarrollo del daño por frío, analizado a través del ID (tabla V-4), mostró un incremento a lo largo del almacenamiento de frutos control y tratados, siendo ligeramente menor ( $p < 0,05$ ) en frutos tratados luego de 7 y 9 días. Al final del almacenamiento los frutos controles mostraron gran desarrollo de los síntomas de daño por frío y un tejido jugoso, a diferencia de los frutos tratados que mostraron un tejido de apariencia corchosa. No hubo desarrollo fúngico tanto en frutos controles como tratados a la salida de cámara. Luego de la transferencia a  $20^\circ\text{C}$  por 48 h hubo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de los valores de ID tanto en frutos control como tratados respecto de los ID correspondientes a

la salida de cámara. Aquí también el incremento logrado por los frutos tratados fue menor respecto de los frutos control. Cuando los frutos fueron transferidos a 20°C se halló desarrollo fúngico en el cáliz que, en frutos controles abarcó luego de 6d a 0°C + 48h a 20°C un 15% del cáliz y en frutos tratados el desarrollo cubrió luego de 9 d a 0°C + 48h a 20°C el 5% del cáliz.

La pérdida de peso (tabla V-4) de frutos controles y tratados con MJ 10<sup>-5</sup>M a la salida de cámara aumentó paulatinamente a lo largo del almacenamiento y fue comparable entre ambos tipos de frutos (p>0,05). Luego de 9 días no superó el 0,2%. La transferencia de los frutos a 20°C por 48 h provocó un aumento significativo (p<0,05) de la pérdida de peso en ambos casos, aunque los valores nunca superaron el 0,7%.

Las medidas de firmeza (tabla V-4) mostraron valores constantes hasta el día 7 en frutos controles y una ligera disminución (p<0,05) luego de 9 días de almacenamiento. Los frutos tratados, en cambio, mantuvieron valores prácticamente constantes a lo largo del almacenamiento.

**Tabla V-4:** Influencia del tratamiento con MJ 10<sup>-5</sup>M sobre el índice de daño (ID), la pérdida de peso, la firmeza, el contenido de etileno interno y la composición de la atmósfera (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) de frutos almacenados a 0°C por 9 días y 48 h adicionales a 20°C recubiertos con la película PD941.

	Índice de daño		Pérdida peso (%)		Firmeza (N.mm <sup>-1</sup> )		Etileno interno .10 <sup>3</sup> (μl.kg <sup>-1</sup> )		CO <sub>2</sub> (%)		O <sub>2</sub> (%)	
	SC <sup>a</sup>	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C	SC	a 20°C
<i>(A) - Controles</i>												
0d	1,0	-	-	-	2,24	-	ND <sup>b</sup>	-	0,03	-	21,0	-
2d	1,4	1,8	0,01	0,56	2,53	2,42	15,0	81,4	2,55	3,42	12,9	8,2
6d	2,8	3,4	0,06	0,60	2,78	2,90	13,3	88,3	2,60	3,24	12,8	8,8
7d	3,5	4,2	0,17	0,67	2,29	1,17	8,6	65,2	2,53	4,12	12,2	7,5
9d	4,2	4,5	0,19	0,69	1,53	0,91	2,2	24,6	2,97	4,23	12,0	7,2
<i>(B) - Tratados</i>												
0d	1,0	-	-	-	2,24	-	ND	-	0,03	-	21,0	-
2d	1,5	1,8	0,01	0,60	2,54	2,33	2,0	74,4	2,45	3,58	12,8	8,2
6d	2,8	3,0	0,08	0,65	3,21	3,56	2,3	81,6	2,33	3,87	12,8	8,0
7d	3,2	4,0	0,16	0,67	2,58	2,91	6,3	60,1	2,50	4,23	12,3	7,4
9d	3,8	4,2	0,19	0,69	2,59	2,78	3,4	38,3	2,69	4,45	12,3	7,2
	<i>LSD = 0,1</i>		<i>LSD = 0,03</i>		<i>LSD = 0,44</i>		<i>LSD = 3,8</i>		<i>LSD = 0,81</i>		<i>LSD = 1,8</i>	

<sup>a</sup> SC = Salida de Cámara

<sup>b</sup> ND = No Detectable



El contenido de etileno interno (tabla V-4) no fue detectable al inicio del almacenamiento. Los frutos control mostraron un incremento del etileno al día 2, se mantuvo prácticamente constante hasta el día 6 y posteriormente disminuyó ( $p < 0,05$ ). El contenido de etileno en los frutos tratados fue aproximadamente 7 veces menor al observado en los frutos control, hasta el día 6. Durante los días 7 y 9 los valores alcanzados fueron comparables ( $p > 0,05$ ). La transferencia a 20°C por 48 h incrementó los niveles de etileno en frutos control y tratados, siendo ligeramente mayor en los frutos control.

La composición de la atmósfera (tabla V-4), tanto de frutos control como tratados, reveló valores prácticamente constantes a partir del día 2 de almacenamiento ( $p > 0,05$ ). El tratamiento con MJ  $10^{-5}M$  no causó variaciones en los porcentaje de  $CO_2$  y  $O_2$  respecto de los controles. Los valores se mantuvieron cercanos al 2,5% de  $CO_2$  y 12,5% de  $O_2$  a la salida de cámara; y 3,9% de  $CO_2$  y 7,8% de  $O_2$  luego de la transferencia a 20°C por 48 h.

### V-2.3. Discusión

Tratamientos con MJ han sido empleados para mantener la calidad de productos mínimamente procesados ya sea por lograr el incremento de la resistencia al crecimiento bacteriano, como así también por obtener una disminución en la incidencia del daño por frío (Buta y Moline, 1998). El MJ es una sustancia natural no-tóxica, estable a temperatura ambiente, efectiva a bajas concentraciones, barata y conveniente para efectuar las aplicaciones (Wang, 1998).

En nuestro caso, los valores de ID y  $L_0$  obtenidos luego de 7 días de almacenamiento a 0°C demostraron que sólo el tratamiento con MJ  $10^{-5}M$  por inmersión y posterior empacado en AMP retardó ligeramente el daño por frío en los frutos respecto de aquellos empacados sólo en AMP. Es así que la velocidad de incremento de ID durante el almacenamiento a 0°C de frutos control fue 0,341 ( $s_b=0,016$ ,  $r=0,996$ ) y de frutos tratados fue 0,308 ( $s_b=0,005$ ,  $r=0,999$ ), lo que implica una reducción del daño por frío sólo del 10%.

La mayor diferencia entre estos frutos se observó al día 9 cuando la incidencia del almacenamiento causó ablandamiento del tejido de frutos control, tornándolo jugoso y generando como resultado menores valores de firmeza. Por el contrario, los frutos tratados exhibieron un tejido corchoso a este tiempo de almacenamiento. González-Aguilar y col. (2000) hallaron que los tratamientos con MJ  $10^{-4}$  M en la modalidad de vapor, lograron reducir el daño por frío en mangos sin alterar el proceso normal de maduración. También, su aplicación en zucchini (Wang y Buta, 1994), rábano (Wang, 1998) y pimiento mínimamente procesado (Buta y Moline, 1998) retardó el daño por frío.

El tratamiento con MJ no afectó la pérdida de peso ni la composición de la atmósfera respecto de los frutos control. Tampoco provocó un gran incremento del contenido de etileno interno, como se observó en frutos control. Perez y col. (1997) hallaron que los tratamientos con MJ incrementaban la producción de etileno en frutillas. Fan y Mattheis (1999) informaron que la producción de etileno disminuía entre los días 0 y 3 posteriores al tratamiento de manzanas con MJ y posteriormente dicha producción incrementaba hasta valores cercanos a los alcanzados por frutos control.

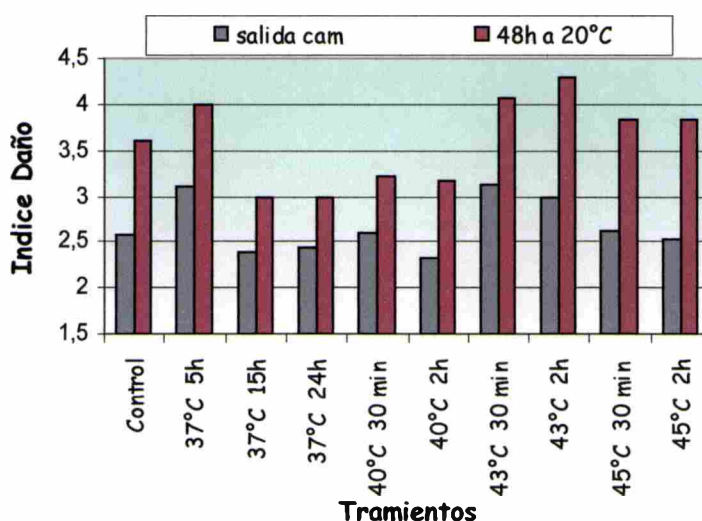
De acuerdo a los resultados obtenidos el tratamiento con MJ puede considerarse poco efectivo, bajo las condiciones empleadas en este trabajo, para reducir el daño por frío de berenjenas Money Maker N°2.

### V-3. TRATAMIENTO TÉRMICO Y ALMACENAMIENTO EN AMP

Con el tratamiento térmico (TT) y posterior empacado en AMP se buscó retardar aún más el daño por frío, como así también disminuir o inhibir el desarrollo de hongos sobre el cáliz de los frutos. Al igual que en la sección V-2, se empleó solamente la película PD941 para generar un empacado en AMP.

## V-3.1. Selección del TT

La figura V-12 muestra los valores de índice de daño (ID) para frutos control y tratados térmicamente a las distintas temperaturas y tiempos ensayados, luego de 7 días de almacenamiento y su posterior transferencia a 20°C por 48 h. Los valores de ID demuestran que los TT a 37°C por 5 h y a 43 y 45°C, por 30 min y 2 h, no resultaron apropiados para retardar el daño por frío de los frutos. Estos TT mostraron un ID superior al control a la salida de cámara y/o luego de la exposición a 20°C ( $p < 0,05$ ). En los TT a 37°C por 15 y 24 h y 40°C por 30 min y 2 h se obtuvieron valores de ID similares o menores al control a la salida de cámara (fig. V-12). Sin embargo, luego del pasaje a 20°C los frutos tratados de esta forma presentaron valores menores de ID que el control ( $p < 0,05$ ), mostrando así un menor desarrollo de los síntomas de daño.



**Figura V-12:** Índice de daño por frío de berenjenas tratadas térmicamente y almacenadas en AMP durante 7 días a 0°C (salida de cámara) y luego del pasaje a 20°C por 48 h adicionales. LSD = 0,15

Por otro lado, los frutos tratados a 37°C por 5 h y a 43°C por 30 min y 2 h, presentaron valores menores de  $L_0$  ( $p < 0,05$ ) que el control, lo cual indicó que con estos tratamientos se indujo un mayor pardeamiento de la pulpa (fig. V-13). También, los frutos tratados a 37°C por 15 y 24 h mostraron valores menores de  $L_0$  luego del pasaje a 20°C (fig.

V-13,  $p < 0,05$ ). En cambio, con el TT a 40°C por 30 min los frutos presentaron un valor de  $L_0$  comparable al control a la salida de cámara y mayor luego del pasaje a 20°C ( $p > 0,05$ ). En tanto que con los TT a 40°C por 2 h y 45°C por 30 min y 2 h los frutos mostraron valores de  $L_0$  superiores al control a la salida de cámara ( $p < 0,05$ ) y sólo con los TT de 40 y 45°C por 2 h se obtuvieron valores de  $L_0$  mayores luego del pasaje a 20°C ( $p < 0,05$ ), indicando así que el pardeamiento de semillas y pulpa fue menor.

Se eligió entonces el TT a 40°C por 2 h porque fue aquel que indujo un menor desarrollo de síntomas de daño (menor ID y mayor  $L_0$ ), tanto a la salida de cámara como luego del pasaje a 20°C.

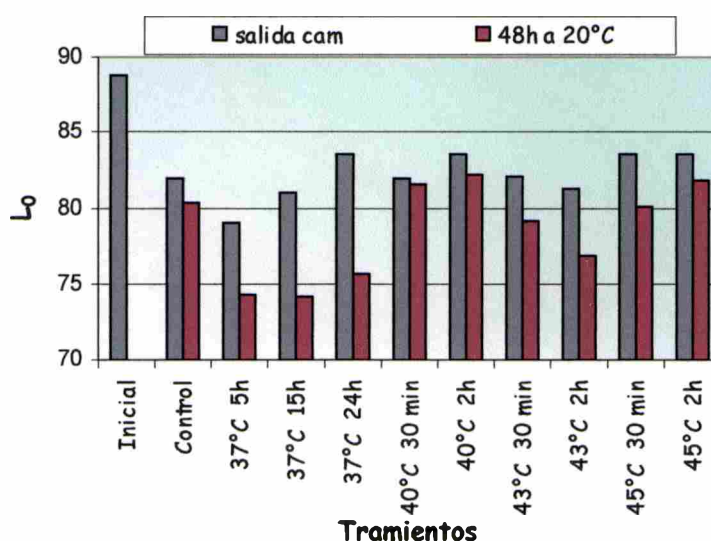


Figura V-13: Pardeamiento de la pulpa ( $L_0$ ) de berenjenas sometidas a los distintos TT y posterior almacenamiento en AMP por 7 días a 0°C y posteriores 48 h a 20°C. LSD = 0,45

### V-3.2. Evolución del daño por frío con el TT elegido

Los frutos control y tratados a 40°C por 2 h y empacados en AMP presentaron una evolución del ID con el tiempo de almacenamiento a 0°C como se muestra en la figura V-14. Los frutos control presentaron al día 6 un leve desarrollo de semillas pardeadas y escaldaduras debajo del cáliz (ID 3,0). Luego de 7 días dicho desarrollo se intensificó y

estuvo acompañado de pardeamiento en la pulpa, mientras que la piel poseía un aspecto rugoso (ID 3,2). A los 9 días de almacenamiento, hubo punteado superficial y escaldaduras incipientes en la zona ecuatorial sumadas a un porcentaje mayor de desarrollo de los síntomas mencionados anteriormente (ID 3,7). En todos los casos, la transferencia a 20°C por 48 h intensificó los síntomas de daño y generó la aparición de desarrollo fúngico en los extremos del cáliz, pero el mismo no superó el 15% de la superficie total del cáliz al final del almacenamiento.

Los valores de ID crecieron en forma lineal durante el almacenamiento. La velocidad, a la salida de cámara, para frutos control fue de 0,295 ( $s_b=0,017$ ,  $r=0,992$ ) y para frutos tratados fue de 0,239 ( $s_b=0,013$ ,  $r=0,993$ ). Estos valores demostraron que el TT y posterior empacado de los frutos en AMP retardó un 19% el desarrollo del daño por frío respecto de los frutos empacados sólo en AMP.

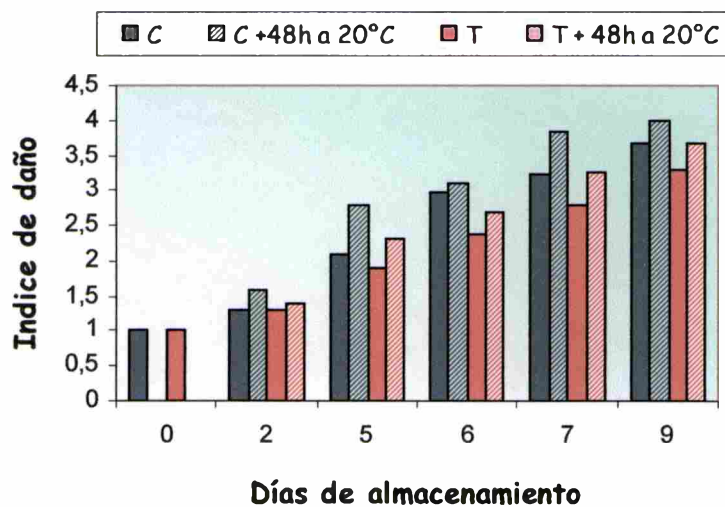


Figura V-14: Índice de daño por frío de berenjenas control (C) y tratadas a 40°C por 2 h (T) almacenadas en AMP, con la película PD941, a 0°C y 48 h adicionales a 20°C. LSD = 0,12

Los frutos tratados o expuestos a 40°C por 2h, previo al empacado en el mismo tipo de película, tuvieron un retraso en la aparición de las escaldaduras debajo del cáliz y desarrollo de semillas pardeadas. Estos síntomas surgieron al día 7 y de forma incipiente (ID 2,8). Además, al día 9 estos frutos no desarrollaron punteado superficial (ID 3,3) y el

pardeamiento en pulpa fue significativamente menor al de los controles. Sólo se observaron escaldaduras en la zona ecuatorial cuando los frutos fueron transferidos a 20°C luego de 9 días. Similar a lo sucedido con los frutos control, cuando los frutos se transfirieron a 20°C por 48 h la incidencia de la temperatura de daño se intensificó y se observó un ligero desarrollo fúngico, que a diferencia de los frutos control, no superó el 5% de la superficie total del cáliz al final del tratamiento.

No hubo diferencias entre frutos controles y tratados más allá de los 9 días de almacenamiento a 0°C, donde el daño era elevado (datos no mostrados).

En la figura V-15 se muestran los frutos luego de 9 días de almacenamiento en AMP a 0°C, sin tratamiento previo (control) y tratados tanto a 40°C por 2 h como con MJ 10<sup>-5</sup>M por inmersión (sección V-2) previo al empacado. Es evidente que el TT fue más efectivo en el retardo del daño por frío que el tratamiento con MJ.

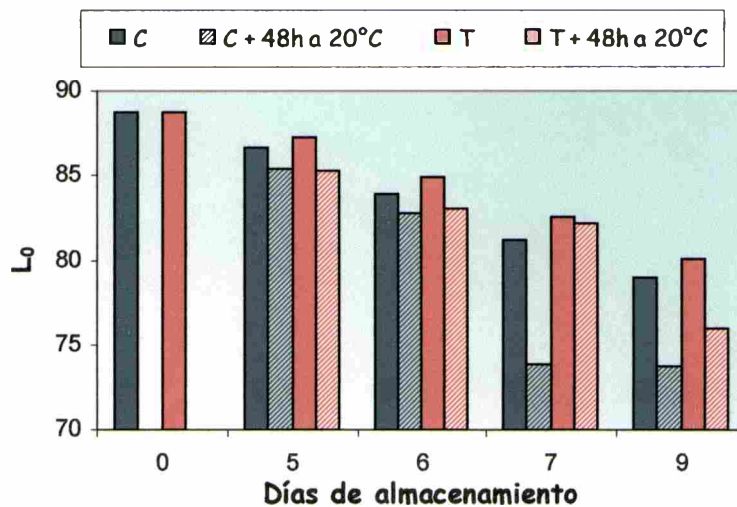


Figura V-15: Frutos control (izq), tratado a 40°C por 2 h (centro) y tratado con MJ 10<sup>-5</sup>M (der) , empacados con la película PD941 y almacenados a 0°C durante 9 días.

### V-3.3. Cambios en el pardeamiento de la pulpa

En la figura V-16 se muestra la diferencia en el desarrollo del pardeamiento de semillas y/o pulpa, a través de la disminución de los valores de  $L_0$  en frutos control y tratados térmicamente a 40°C por 2h.

En frutos control y a la salida de cámara, el valor de  $L_0$  disminuyó linealmente con una velocidad de 0,946 ( $r = 0,972$ ) a lo largo del almacenamiento, mientras que en frutos tratados lo hizo con una velocidad de 0,796 ( $r = 0,961$ ), siendo ésta valor aproximadamente un 16% menor al primero ( $p < 0,05$ ). Luego del pasaje a 20°C por 48 h, los frutos control mostraron una disminución abrupta de  $L_0$  luego del día 7, mientras que en los frutos tratados los valores de  $L_0$  disminuyeron en mucha menor magnitud. Esto estaría indicando que el efecto de la transferencia a temperatura ambiente fue menos notorio en frutos tratados debido, probablemente, al retardo en la incidencia del daño por frío.



**Figura V-16:** Evolución del valor de  $L_0$  del tejido de frutos control (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2 h almacenados en AMP a 0°C y 48 h adicionales a 20°C. LSD = 0,36

### V-3.4. Cambios en la pérdida de electrolitos

Los valores de pérdida de electrolitos en frutos control y tratados aumentaron progresivamente a lo largo del tiempo de almacenamiento a 0°C (fig. V-17). Luego de 6 días de almacenamiento tanto frutos tratados como controles aumentaron el nivel de pérdida de electrolitos respecto del inicio ( $p < 0,05$ ). Luego de 7 días de almacenamiento, los niveles logrados fueron 2,7 y 3,3 veces mayor respecto del valor inicial en frutos tratados y control, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Dicha diferencia se incrementó aún más luego de 9 días de almacenamiento. Estos resultados contribuyeron a demostrar la menor evolución de los síntomas de daño por frío a nivel de integridad de membranas en frutos tratados a 40°C por 2 h.

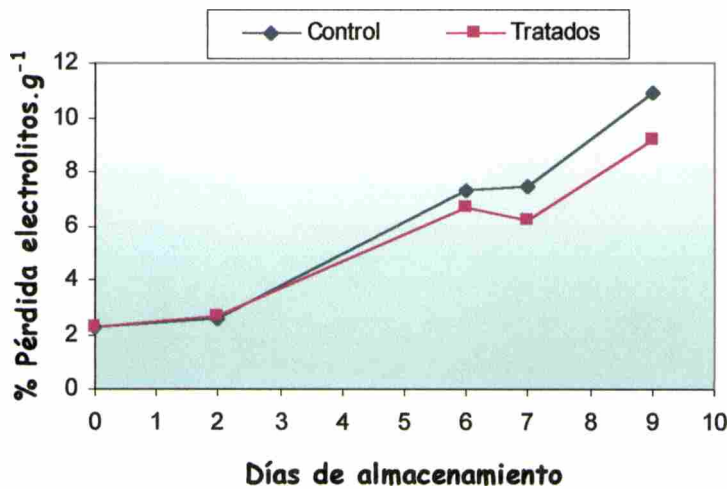


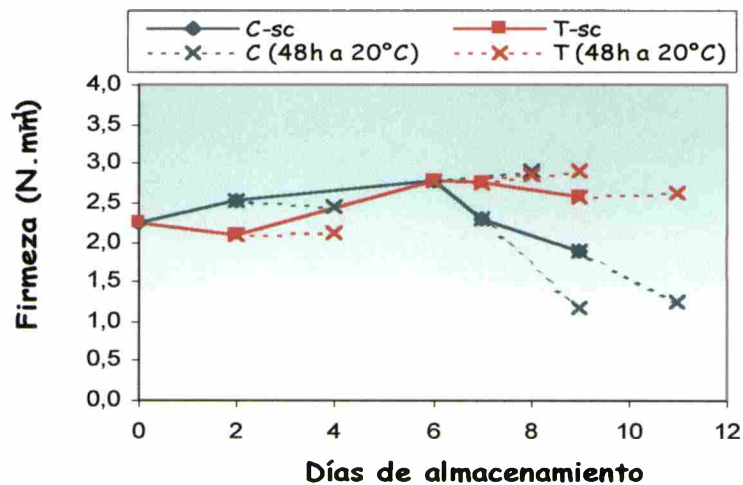
Figura V-17: Pérdida de electrolitos de tejido perteneciente a frutos control y tratados térmicamente a 40°C por 2h almacenados en AMP a 0°C. LSD = 0,41



### V-3.5. Evolución de la firmeza

Tanto los frutos control como tratados tuvieron un ligero aumento en los valores de firmeza hasta el día 6 de almacenamiento (fig. V-18). Durante los días posteriores, en ambos tipos de frutos se observó una tendencia a disminuir la firmeza; sin embargo, luego de 9 días los frutos control alcanzaron un valor 15% menor respecto del inicial, mientras que en los frutos tratados la firmeza disminuyó hasta valores cercanos a los del inicio ( $p < 0,05$ ).

Luego de la transferencia a 20°C, los frutos control mantuvieron el valor de firmeza de salida de cámara luego de 2 d y 6 d a 0°C + 48 h a 20°C, y lo disminuyeron luego de 7 d y 9 d a 0°C + 48 h a 20°C, probablemente debido al desarrollo de una textura jugosa y deteriorada a causa del daño por frío. Por otro lado, los valores de firmeza de los frutos tratados permanecieron prácticamente constantes luego de la transferencia a 20°C por 48h.



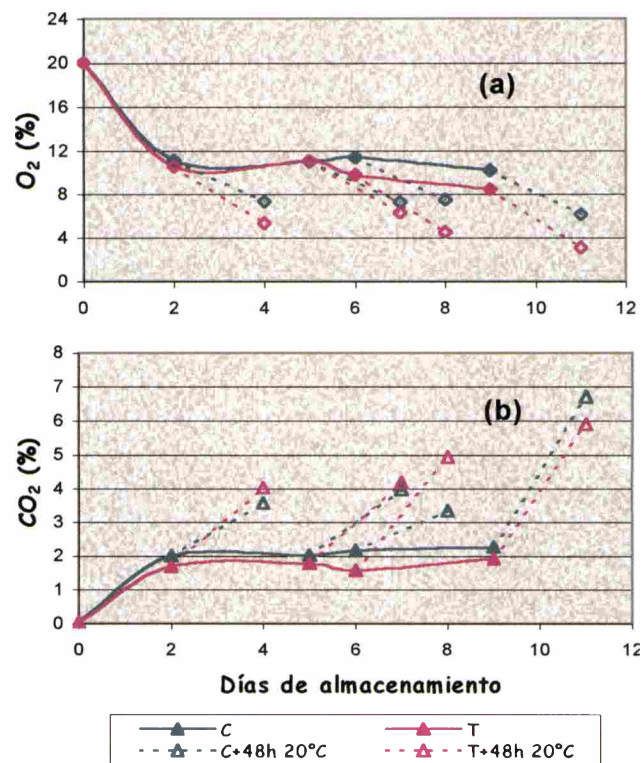
**Figura V-18:** Evolución de la firmeza de frutos controles (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2h, durante el almacenamiento en AMP a 0°C. Los valores corresponden a frutos recién salidos de cámara (SC) y luego de permanecer 48 h adicionales a 20°C. LSD = 0,35

### V-3.6. Cambios en la composición de la atmósfera dentro del empaquetamiento

Las figuras V-19a y V-19b muestran los porcentajes de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente, de la atmósfera interna de los empaques de frutos controles y tratados.

La atmósfera interna de los empaques con berenjenas control varió rápidamente hasta los 2 días y luego permaneció constante ( $p > 0,05$ ) con valores cercanos a 11% de O<sub>2</sub> y 2% de CO<sub>2</sub>. Luego del pasaje a 20°C los niveles de O<sub>2</sub> disminuyeron ( $p < 0,05$ ), en general, hasta alcanzar un 7% aproximadamente. Mientras que, en el caso de CO<sub>2</sub> se alcanzaron valores cercanos a 3,5% luego de 2-5-6 d + 48 h a 20°C; y 6,7% luego de 9 d + 48 h a 20°C.

Los frutos tratados térmicamente alcanzaron niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> comparables ( $p > 0,05$ ) a los frutos controles durante todo el almacenamiento a 0°C. En cambio, cuando estos frutos se llevaron a 20°C por 48 h los niveles de O<sub>2</sub> fueron, en general, ligeramente menores y los de CO<sub>2</sub> prácticamente iguales a los de los frutos control, excepto al día 6.



**Figura V-19:** Porcentaje de O<sub>2</sub> (a) y CO<sub>2</sub> (b) en la atmósfera interna de los empaques de AMP conteniendo los frutos control (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2 h, durante el almacenamiento a 0°C y 48 h adicionales a 20°C.

LSD<sub>O<sub>2</sub></sub> = 2,2; LSD<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,6.

### V-3.7. Evolución del contenido de etileno interno

El contenido de etileno interno (fig. V-20) al inicio del almacenamiento no fue detectable. En frutos control el contenido de etileno interno aumentó rápidamente al día 2 ( $p < 0,05$ ), se mantuvo aproximadamente constante hasta el día 6 ( $p > 0,05$ ) y disminuyó a valores cercanos al inicial al día 9 ( $p < 0,05$ ). En cambio, en frutos tratados, el contenido de etileno aumentó rápidamente al día 2 ( $p < 0,05$ ), lentamente hasta el día 7 ( $p < 0,05$ ) y luego disminuyó a valores similares a los observados al día 2 ( $p < 0,05$ ). El etileno generado por los frutos tratados fue mayor, en general, respecto de los frutos control a lo largo del almacenamiento.

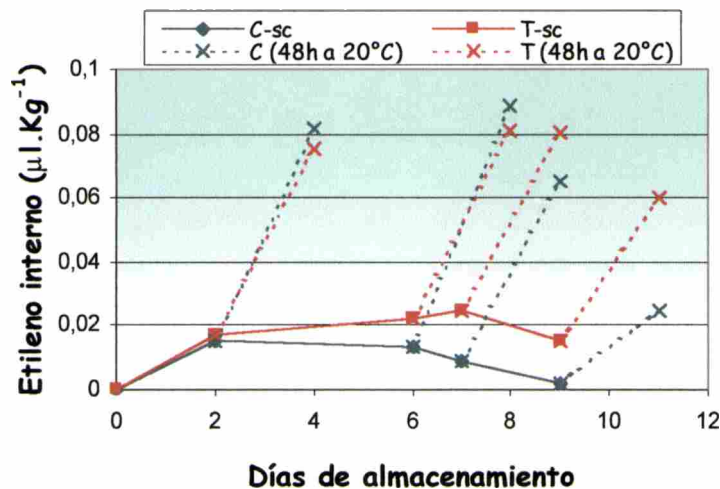


Figura V-20: Contenido de etileno interno de frutos controles (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2 h, y almacenados en AMP a 0°C y 48 h adicionales a 20°C. LSD = 0,007

Luego de la transferencia a 20°C, el contenido de etileno interno (fig. V-20) aumentó en todos los días analizados tanto en frutos control como en tratados ( $p < 0,05$ ). Los valores alcanzados al cabo de 2 d y 6 d a 0°C + 48 h a 20°C fueron comparables entre frutos controles y tratados, mientras que luego de 7 d y 9 d a 0°C + 48 h a 20°C los valores alcanzados por frutos tratados fueron mayores respecto de los frutos control.

### V-3.8. Contenido de proteínas

La figura V-21 muestra el contenido porcentual de proteínas en extractos crudos de pulpa de berenjena. La fracción de proteínas solubles constituyó el 80% del contenido proteico total al inicio del almacenamiento. Tanto en frutos control como tratados dicho porcentaje mostró un ligero aumento ( $p < 0,05$ ) alcanzando un máximo de 85 y 90% luego de 6 días, respectivamente. En tanto que la fracción de proteínas insolubles constituyó el 20% del contenido proteico total. Dicho porcentaje disminuyó ( $p < 0,05$ ) hasta alcanzar un mínimo luego de 6 días que correspondió a un 15 y 10% en frutos control y tratados, respectivamente.

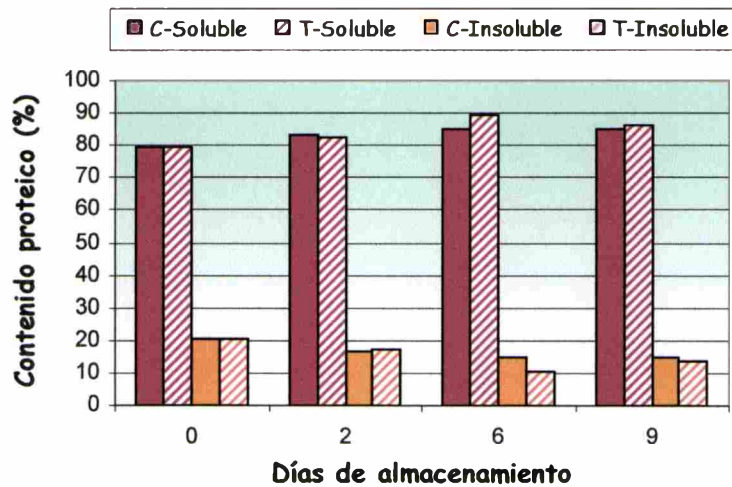
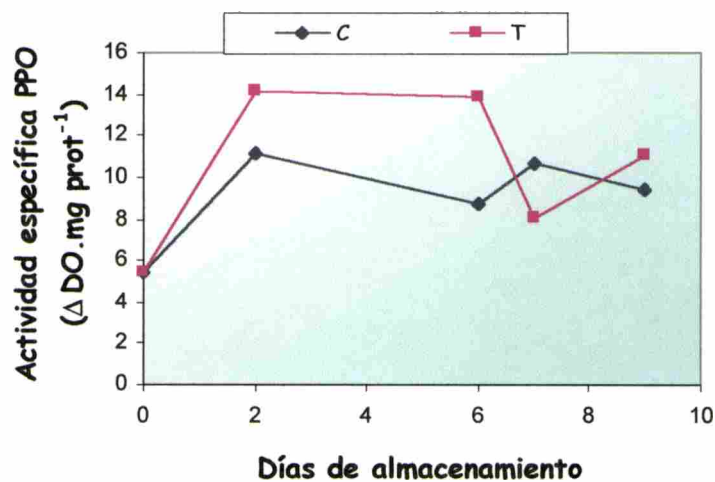


Figura V-21: Contenido proteico de frutos controles (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2 h, y almacenados en AMP a 0°C durante 9 días. LSD = 1,8.

### V-3.9. Efecto del tratamiento sobre la actividad enzimática de PPO

Se analizó la actividad de PPO sobre extractos totales de pulpa de berenjena almacenada a 0°C, empacada en AMP (control) y tratada térmicamente previo al empacado en AMP (tratada).

Luego de 2 días de almacenamiento a 0°C, la actividad específica de PPO en frutos control aumentó ( $p < 0,05$ ) llegando al doble respecto del valor inicial (fig. V-22). De ahí en adelante la actividad PPO se mantuvo prácticamente constante ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, los frutos tratados térmicamente mostraron un aumento mayor de la actividad enzimática luego de 2 días (2,5 veces mayor), la misma se mantuvo constante hasta el día 6 ( $p > 0,05$ ) y luego disminuyó ( $p < 0,05$ ) hasta el final del almacenamiento alcanzando valores 2 veces mayor que el inicial (fig. V-22). Los frutos tratados mostraron, en general, valores superiores a los de frutos control, a lo largo de todo el almacenamiento.

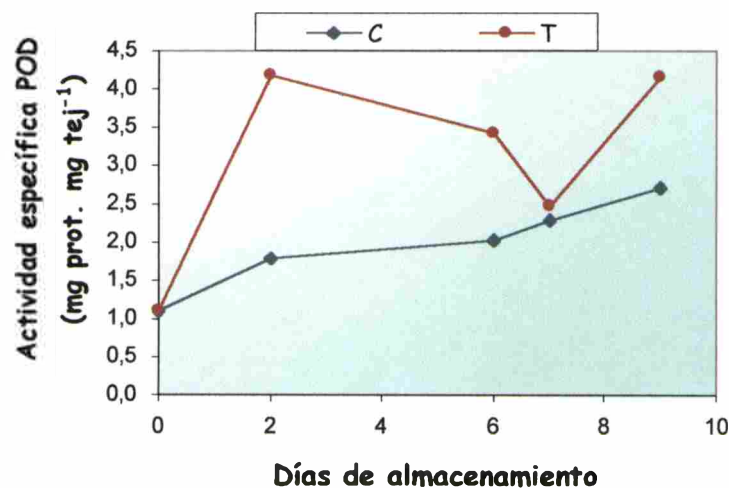


**Figura 18:** Actividad específica de PPO total en frutos control (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2 h, y almacenados en AMP a 0°C durante 9 días. LSD = 1,01

### V-3.10. Efecto del tratamiento sobre la actividad enzimática de POD

Se efectuó la medida de la actividad POD en extractos totales de pulpa de berenjena, para lo cual se varió la concentración de pirogalol entre 3 y 60 mM y la de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 1 y 8 mM. Finalmente se halló que la mejor condición para efectuar la medida de actividad de esta enzima era emplear 9 mM de pirogalol y 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los frutos control mostraron un aumento paulatino en la actividad específica de POD a lo largo del almacenamiento, obteniendo un valor 2 veces mayor, respecto del inicial, luego de 9 días ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, los frutos tratados experimentaron un incremento de la actividad luego de 2 días de almacenamiento alcanzando un valor 3,8 veces superior al inicial ( $p < 0,05$ ). Posteriormente la actividad disminuyó hasta el día 7 a un valor que duplica el inicial ( $p < 0,05$ ), y finalmente aumentó al día 9 alcanzando un valor comparable al logrado al día 2 ( $p < 0,05$ ). En general, la actividad específica de POD fue mayor en frutos tratados térmicamente respecto de frutos control durante todo el almacenamiento.



**Figura 19:** Actividad específica de POD total en frutos control (C) y tratados (T) térmicamente a 40°C por 2 h, y almacenados en AMP a 0°C durante 9 días. LSD = 0,35

### V-3.11. Discusión

Al combinar dos tratamientos físicos poscosecha tales como tratamiento térmico y AMP se logró retardar aún más el daño por frío, que sólo con AMP. No todos los tratamientos térmicos ensayados lograron retardar el daño por frío sino que, dentro de los 9 tratamientos llevados a cabo, el más eficiente fue el de 40°C por 2 h. Rodríguez y col.

(2001) informaron que el tratamiento térmico más efectivo para la variedad Black Nite de berenjenas era 35°C por 1 h. En nuestro caso, los frutos tratados mostraron menores valores de velocidad de evolución de los valores de ID (19%) y L<sub>0</sub> (16%) respecto de los frutos control. El menor desarrollo de los síntomas de daño por frío en frutos tratados también se pudo apreciar al observar mayores valores de firmeza y una menor pérdida de electrolitos (mejor integridad de membranas) respecto de los frutos control. Lurie y Klein (1990) han informado que no sólo la presencia de las HSP reducen la sensibilidad al daño por frío en frutos, sino también las alteraciones sufridas por las membranas. Saltveit (1991) halló una menor pérdida de electrolitos luego de exponer discos de tomate a 37°C por 4 h y posterior exposición a temperaturas de daño por frío. El empleo de TT con el fin de retardar el daño por frío fue empleado con éxito por Porat y col. (2000) en pomelo, Woolf y col. (1997) en caqui, Lurie y Klein (1991) en tomate, Wang (1994) en zucchini, entre otros. En este trabajo, el TT también logró retardar la aparición de hongos en el cáliz de los frutos.

La composición de la atmósfera en los empaquetamientos conteniendo frutos tratados mostró niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> relativamente comparables a la de los frutos control. El contenido de etileno interno de frutos tratados aumentó en mayor magnitud respecto de frutos control, en los primeros días de almacenamiento; lo cual estaría mostrando una inducción de su biosíntesis debida al estrés causado por el tratamiento térmico.

A lo largo del almacenamiento a 0°C, el contenido de proteínas solubles aumentó ligeramente y prácticamente no hubo diferencias entre frutos control y tratados.

Durante todo el almacenamiento a 0°C se observaron mayores valores de actividad PPO respecto del inicio. A su vez, los frutos tratados térmicamente mostraron un aumento mayor respecto de los frutos control. Por el contrario, Loaiza-Velarde y col. (1997) hallaron que la actividad PPO disminuía luego de las 24 h posteriores al tratamiento térmico efectuado sobre lechuga. Cabe destacar que, en el presente trabajo, durante los primeros días de almacenamiento si bien la actividad PPO fue alta, los valores de ID, L<sub>0</sub> y pérdida de electrolitos mostraron que el daño por frío era leve (poco pardeamiento y leve alteración de membranas). Sin embargo, al final del almacenamiento la actividad de PPO

disminuyó en frutos tratados y se mantuvo constante en frutos control cuando los valores de ID,  $L_0$  y pérdida de electrolitos evidenciaron una mayor evolución del daño por frío. Esto estaría indicando que gracias a la desorganización celular los sustratos estarían más disponibles para ser oxidados, lo que incrementa el pardeamiento sin un aumento de la actividad enzimática. Autores tales como Leja y col. (2003) también hallaron que luego del almacenamiento refrigerado de manzanas, la actividad PPO disminuía.

En el caso de la actividad POD, los valores hallados durante el almacenamiento fueron superiores respecto del inicio. Incluso los frutos tratados térmicamente mostraron una mayor actividad POD respecto de los frutos control. Lurie y col (1997) también hallaron un aumento de la actividad POD con el tratamiento térmico de tomates. Existe suficiente evidencia de que distintos tipos de estrés causan un incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno, las cuales contribuyen significativamente al daño celular (Prasad y col., 1994; Foyer y col., 1997). Dichas especies,  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno),  $O_2^-$  (superóxido),  $OH$  (radical hidroxilo) y  $^1O_2$  (oxígeno singlete) están presentes en todas las plantas superiores en distinto grado como resultado del metabolismo aerobio normal. Si se permite su acumulación, estas especies reactivas de oxígeno pueden causar daño a los componentes celulares, alterando severamente las funciones metabólicas (Mallick y Mohn, 2000) y generando así el daño oxidativo. Enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), POD, glutathion reductasa (GR) entre otras, son algunos los sistemas reparadores que poseen las plantas superiores. Por lo tanto, la habilidad del vegetal para mejorar la capacidad de dichos sistemas es un elemento clave en la tolerancia al estrés (Anderson y col., 1995). En nuestro trabajo, las berenjenas han incrementado la actividad POD frente al estrés por baja temperatura (frutos control) y en mayor magnitud cuando los frutos habían sido previamente tratados térmicamente. También, el mayor incremento de la actividad POD en frutos tratados térmicamente pudo estar relacionado con el mayor nivel de etileno en estos frutos, dado que autores como Leja y col. (2003), entre otros, han informado que la actividad de POD es estimulada por el etileno.



## V - DISCUSION

Como ya se ha comentado, los frutos de origen tropical, como la berenjena, son sensibles al daño por frío cuando son almacenados a temperaturas por debajo del valor crítico. En el presente capítulo se ha empleado el almacenamiento a 10°C como aquél que no causa daño por frío y por lo tanto recomendado; mientras que el almacenamiento a 0°C ha sido tomado como modelo de almacenamiento bajo condiciones de daño por frío.

En el presente capítulo se han buscado alternativas de almacenamiento tendientes a mejorar la calidad del fruto una vez cosechado, como así también a minimizar o retardar los síntomas de daño por frío.

En primera instancia se empleó el almacenamiento en AMP en lugar del empaquetamiento en películas de LDPE perforadas. Una menor deshidratación de los frutos almacenados en AMP se tradujo en una menor pérdida de peso. Se obtuvo una menor velocidad de desarrollo de los síntomas de daño por frío cuando se emplearon, para el almacenamiento de los frutos, las películas no perforadas LDPE (20% menor) y PD941 (15% menor), respecto de PD900 y LDPE perforada. El retardo de los síntomas de daño no pareció estar relacionado solamente con los contenidos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dentro de los empaques. Debido a la menor opacidad y tendencia a formar niebla de la película PD941 se eligió a ésta para ensayar los tratamientos combinados. El empleo de esta tecnología poscosecha para retardar el daño por frío fue utilizada por varios autores, entre ellos Serrano y col. (1997) con pimientos verde-maduros; Wang y Qi, (1997) con pepinos y Rodríguez y col. (2001) con berenjenas Black Nite. La alta HR dentro del empaque favoreció el desarrollo fúngico en los extremos inferiores del cáliz de los frutos. Esto fue solucionado empleando un tratamiento por inmersión en solución del fungicida procloraz (1000 ppm). Dado que mundialmente se tiende a reducir o eliminar el empleo de químicos para la conservación de frutos y vegetales, se ensayó el efecto de otros tratamientos para tal fin.

Posteriormente, se ensayaron distintas concentraciones y modalidades de empleo del MJ previo al empacado con AMP. La inmersión de los frutos en MJ  $10^{-5}M$  y posterior empacado en AMP, con la película elegida, logró retardar un 10% los síntomas de daño por frío cuando los mismos fueron almacenados a  $0^{\circ}C$  durante 9 días. Este retardo se evidenció a través de la menor evolución en los valores de ID,  $L_0$  y firmeza. Wang (1998) logró reducir el daño por frío en rábano y Meir y col. (1996) lo emplearon con éxito en palta, pomelo y pimiento. El desarrollo fúngico fue menor en los frutos tratados respecto de los frutos controles y se observó cuando los frutos fueron transferidos a  $20^{\circ}C$  por 48 h luego de estar 9 días a  $0^{\circ}C$ . Buta y Moline (1998) hallaron buenos resultados cuando emplearon MJ para reducir la contaminación microbiológica en apio y pimiento mínimamente procesados.

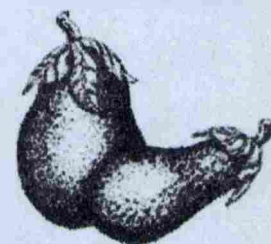
Finalmente se decidió analizar el efecto de los TT sobre el retardo de los síntomas de daño, dado que el empleo de esta tecnología ha ido incrementando en los últimos años, dada su gran efectividad (Lurie y Klein, 1990; Porat y col., 2000). Se estudiaron distintos tiempos y temperaturas de exposición, siempre empleando aire seco. Se obtuvieron los mejores resultados cuando se empleó el tratamiento a  $40^{\circ}C$  por 2 h y posterior empacado en AMP con la película seleccionada (PD941). La velocidad de desarrollo de daño por frío fue un 19% menor respecto de los frutos empacados en AMP solamente. Por lo tanto la combinación de estos tratamientos (TT +AMP) obtuvo un mayor retardo de los síntomas de daño respecto de MJ+AMP (10%). Si referimos el retardo de los síntomas de daño por frío respecto del empleo de la película LDPE perforada discutido en la sección V-1.1.4., se observa que el empleo de AMP (con la película PD941) logró un retardo del 15%, el tratamiento con MJ-AMP alcanzó un 23% y el tratamiento TT+AMP obtuvo un valor 30% menor. En frutos tratados térmicamente previo al empacado en AMP se observaron menores valores de ID,  $L_0$  y pérdida de electrolitos, y una mayor firmeza respecto de frutos empacados sólo en AMP. El desarrollo de hongos fue retardado y sólo apareció luego de que los frutos fueran transferidos a  $20^{\circ}C$  por 48 h. El empleo del TT no pareció influir sobre la composición de la atmósfera dentro de los empaques; mientras que el contenido de etileno interno de los frutos tratados incrementó su valor en mayor magnitud respecto de los frutos control, sugiriendo una respuesta más pronunciada a la suma de

estrés (exposición a alta temperatura y posterior almacenamiento a temperatura de daño por frío). También el TT incrementó en mayor magnitud la actividad de la enzima PPO. Dicha actividad se mantuvo alta mientras en el fruto no hubo prácticamente pardeamiento y disminuyó al final del almacenamiento cuando la incidencia del daño por frío mostró pardeamiento de la pulpa. Como se discutió en la sección anterior, la desorganización celular habría favorecido la reacción entre la enzima y los sustratos, sin provocar esto un aumento de la actividad enzimática. Por otro lado la actividad POD también aumentó en mayor medida en frutos tratados térmicamente. Como también se discutió en la sección anterior, esto podría ser el resultado de una mayor activación de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo y/o una estimulación por parte del etileno, en los frutos tratados térmicamente.

## V - CONCLUSIONES

- La pérdida de peso de frutos almacenados en películas no perforadas (AMP) fue menor respecto de frutos empacados con LDPE perforada.
- La composición de la atmósfera interna de los empaques de AMP no presentó mayores diferencias entre las películas usadas tanto en el almacenamiento a 0 como a 10°C.
- El empaquetamiento en AMP, empleando la película PD941, retardó un 15% la evolución del daño por frío de las berenjenas respecto de aquéllas empacadas en LDPE perforada, evidenciado por los valores de ID y L<sub>0</sub>.
- El tratamiento con procloraz 1000 ppm y posterior empacado en AMP provocó una inhibición del desarrollo de hongos en el cáliz de los frutos almacenados a 0°C por 14 días y a 10°C por 23 días, pero no una disminución de los síntomas de daño por frío.
- El tratamiento de los frutos con MJ 10<sup>-5</sup>M y posterior empacado en AMP con la película PD941 causó un leve retardo (10%) de los síntomas de daño por frío de los frutos frente a aquéllos empacados sólo en AMP.
- Las berenjenas tratadas térmicamente a 40°C por 2h y luego empacadas en AMP con la película PD941 mostraron una menor evolución (19%) del desarrollo de daño por frío respecto de los frutos empacados sólo en AMP, hecho evidenciado por los valores de ID, L<sub>0</sub> y pérdida de electrolitos.
- La firmeza mostró mayores valores para frutos tratados térmicamente a 40°C por 2h respecto de los frutos control, indicando una mejor conservación de los mismos.
- El contenido de etileno interno fue mayor en frutos tratados térmicamente respecto de frutos control.

- El contenido de proteínas solubles de las berenjenas fue cercano al 80% al inicio del almacenamiento. A lo largo del almacenamiento a 0°C, dicho porcentaje aumentó ligeramente y prácticamente no se detectaron diferencias entre frutos control y tratados térmicamente.
- Las actividades de PPO y POD fueron mayores en frutos tratados térmicamente respecto de frutos control.
- Los frutos tratados con MJ  $10^{-5}$ M por inmersión y térmicamente a 40°C por 2h, previo al empacado en AMP, mostraron una reducción del desarrollo del daño por frío de un 23 y 30%, respectivamente, en relación a los frutos empacados con la película LDPE perforada.



# ***Discusión general***

---

Las berenjenas son frutos de origen tropical y por tanto sensibles a la exposición a bajas temperaturas. La variedad bajo estudio es de las denominadas Japonesa, de color púrpura-negro y altamente susceptible al daño por frío (Cantwell y Suslow, 1999).

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue estudiar el efecto de las bajas temperaturas sobre algunos aspectos fisiológicos de la berenjena Money Maker N°2 y su relación con el desarrollo del daño por frío, como así también la aplicación de tratamientos que retarden la aparición de dicho daño.

En primera instancia se estudió la evolución del daño por frío y el efecto del estrés por baja temperatura sobre la biosíntesis del etileno, el contenido de antocianinas, color superficial y sobre la actividad PPO. Luego se estudiaron diferentes metodologías para reducir la incidencia del daño y su efecto sobre los aspectos antes señalados.

Para estudiar la evolución del daño por frío en esta variedad de berenjenas, se las expuso a 0, 5 y 10°C. Se halló que las mismas no sufrieron daño por frío al ser almacenadas a 10°C durante 15 días. A esta temperatura, la pérdida de electrolitos fue constante y tampoco hubo alteraciones importantes en la ruta biosintética de etileno, ya que la actividad *in-vivo* de ACCo y los contenidos de ACC, MACC y etileno interno fueron prácticamente constantes a lo largo del almacenamiento. Si bien no hubo pardeamiento de la pulpa medido a través del valor de  $L_0$ , estos frutos mostraron un aumento de la actividad de la enzima PPO, tanto en sus fracciones soluble como insoluble, a partir del día 8 de almacenamiento. Tampoco hubo variaciones apreciables en los parámetros de color y contenido de antocianinas de la piel de los frutos. Por microscopía electrónica, se hallaron espacios intercelulares y degradación parcial de la laminilla media luego de 15 días de almacenamiento, asociado a la senescencia del fruto.

En cambio, durante el almacenamiento a 0 y 5°C los frutos sufrieron daño por frío, lo cual se manifestó a través de diversos síntomas, siendo éstos el resultado de las alteraciones bioquímicas provocadas por las bajas temperaturas. La velocidad de aparición de los síntomas fue mayor a 0°C, y en particular se observó en primera instancia y con

---

mayor intensidad en la zona debajo del cáliz o zona cáliz. A 0°C el daño por frío se manifestó a través de la pérdida de brillo y color luego de 2 días de exposición y en forma más manifiesta a partir de los 5-6 días (punteado incipiente y pardeamiento de semillas y pulpa leve); mientras que a 5°C el daño apareció luego de 8-9 días. A 0°C, el desarrollo del pardeamiento de la pulpa medido por el valor de  $L_0$  también fue más rápido que a 5°C. La pérdida de electrolitos aumentó con el incremento del daño por frío. Al transferir los frutos a 20°C el daño aumentó, tal como ocurre en otras variedades de berenjena (Rodríguez y col., 2001) y en otros frutos. Por microscopía electrónica se observó luego de 8 días y en frutos dañados por el frío, la aparición de espacios intercelulares, membrana plasmática retraída de la pared celular, disolución parcial de la laminilla media y en los casos de mayor daño (día 15) pudo observarse desorganización de organelas, ruptura de tonoplasto y/o ruptura celular. Otros autores hallaron resultados similares en callos de *Cornus stolonifera* (Niki y col., 1978, 1979), tomates (Marangoni y col., 1989) y duraznos (Luza y col., 1992) entre otros.

Respecto de la biosíntesis de etileno, a 0°C se observó que luego de 5 h de exposición hubo un incremento en el contenido de ACC, mientras que el incremento de etileno interno fue luego de 24 h y el de MACC luego de 2 días, tiempos a los cuales el nivel de ACC era mayor que el inicial. Mientras hubo leves síntomas de daño por frío en los frutos, se registraron altos niveles de etileno interno, ACC y MACC; en cambio cuando el pardeamiento en la pulpa y la apariencia toda del fruto denotaba daño por frío notorio, dichos niveles disminuyeron abruptamente llegando, incluso, a valores no detectables de etileno. También se ha informado un incremento de la biosíntesis de etileno ante el almacenamiento refrigerado en frutos como pepinos (Wang y Adams, 1982), pimientos (Lin y col., 1993; Serrano y col., 1997) y manzanas (Jobling y McGlasson, 1995), entre otros. La actividad *in-vivo* de ACCo registró un continuo descenso en frutos almacenados a 0°C, siendo dicha actividad muy baja al día 9, tiempo al cual el contenido de etileno disminuyó a valores no detectables. Dado que esta enzima se hallaría ligada a membrana (Porter y col., 1986; Yang y Hoffman, 1984), la disminución de su actividad podría estar asociada a la pérdida de integridad y propiedades de las membranas, indicada por la elevada pérdida de electrolitos y el desarrollo de síntomas severos de daño por frío. Un



---

comportamiento enzimático similar fue informado en pimientos (Lin y col., 1993), plantines de mung bean (Corbineau y col., 1997) y mango (Lederman y col., 1997). Sin embargo, Lelievre y col. (1995) hallaron que la actividad de ACCo era inducida en manzanas pre-climatéricas dañadas por frío.

El color de las berenjenas Money Maker N°2 fue púrpura-negro en la piel de la zona centro y púrpura-rojizo en la zona cáliz. A bajas temperaturas dichas tonalidades se vieron alteradas, siendo más notorio el efecto en la piel de la zona cáliz y sólo a las temperaturas de daño. La decoloración observada en la piel de los frutos luego de 2 días se correspondió, en zona cáliz, con la disminución del valor de  $a^*$  y Cr; mientras que la evolución de las tonalidades marrones-amarillas debidas a la aparición de escaldaduras se correspondió con el incremento de los valores de  $b^*$ ,  $L^*$  y Hue y una disminución de los valores de  $a^*$  y Cr.

El contenido de antocianinas de la zona centro fue mayor respecto de la zona cáliz, incluso durante el almacenamiento a las temperaturas de daño por frío. Ha sido informado que las antocianinas podrían constituir un mecanismo de defensa frente a la acumulación de ERO debidas al estrés oxidativo (Yamasaki, y col., 1996; y Leng y Qi, 2003), el cual se produce generalmente frente a la exposición a bajas temperaturas (Foyer y col. 1997). Esto estaría en concordancia con la disminución del contenido de antocianinas observada luego de los 2 días de almacenamiento. Por otro lado, su incremento posterior hasta alcanzar un máximo luego de 9 días a 0°C y 13 días a 5°C podría estar relacionado con el incremento de su biosíntesis a causa del aumento de la actividad de PAL observada por diversos autores frente a la exposición a bajas temperaturas (Rivero y col., 2001; Peiser y col., 1998; Kozukue y col., 1979). Finalmente la disminución del contenido de antocianinas hallada al final del almacenamiento se correspondió con la aparición de escaldaduras en la piel de los frutos. A lo largo del almacenamiento a 0°C y en zona cáliz, las variaciones en el contenido de antocianinas se relacionaron con las variaciones del parámetro Cr (menor saturación del color - menor contenido de antocianinas). Como se mencionó anteriormente, el contenido de antocianinas fue mayor en la zona centro respecto de la zona cáliz, hecho que podría estar relacionado con el menor daño por frío

---

observado en esta zona, ya que las antocianinas podrían contribuir a incrementar la tolerancia al daño por frío (Tsuda y col., 1994 y 1996; Noda y col., 1998; Leng, 1998; Leng y Qi, 2003).

La enzima PPO es capaz de oxidar los compuestos fenólicos, y este proceso ha sido relacionado con el deterioro del fruto (Grace y col., 1998; Lafuente y col., 1997; Das y col., 1997). En este trabajo se observó que PPO se hallaba principalmente en forma soluble durante todo el almacenamiento y que poseía actividad alta a bajas temperaturas. Con el desarrollo del daño por frío la actividad PPO disminuyó rápidamente. Resultados similares han sido informados por Coseteng y Lee (1987) en manzana y Cheng y Crisosto (1995) en durazno. Estos resultados evidenciaron una relación directa entre la actividad soluble de PPO a 0°C y el pardeamiento de la pulpa medido a través del parámetro  $L_0$  ( $r = 0,991$ ;  $p = 0,009$ ), ya que cuando la actividad fue alta no había pardeamiento (altos valores de  $L_0$ ), y cuando la actividad fue baja el tejido estaba pardeado (bajos valores de  $L_0$ ).

Cuando el almacenamiento poscosecha de los frutos y vegetales ocasiona daño por frío, se puede recurrir a la combinación de la refrigeración con otras técnicas poscosecha tendientes a aumentar la tolerancia al daño o a retrasar la aparición de los síntomas de daño y así conseguir finalmente un período mayor de vida útil del producto (Hardenburg, 1971). Las tecnologías estudiadas en el presente trabajo de Tesis comprendieron el almacenamiento de los frutos en AMP, con o sin tratamientos previos tales como: inmersión en solución de fungicida, tratamiento con MJ o tratamiento térmico en aire seco.

Para el almacenamiento en AMP se analizó el efecto de distintas películas de permeabilidad diferente, resultando seleccionada la PD941 que logró, en promedio, una AMP de 15,3% de  $O_2$  y 1,8% de  $CO_2$  a partir del día 2 y durante todo el almacenamiento a 0°C. El almacenamiento de los frutos en AMP con esta película logró retardar el daño por frío en un valor cercano al 19%, de acuerdo a la menor velocidad de desarrollo de daño por frío (velocidad=0,225,  $r = 0,995$ ) respecto del almacenamiento de las berenjenas en película perforada (velocidad=0,265,  $r = 0,999$ ). Otros autores también mostraron un retardo en el desarrollo del daño por frío empleando AMP para almacenar pimientos verde-maduros (Serrano y col., 1997), pepinos (Wang y Qi, 1997), mango (Pesis y col.,

---

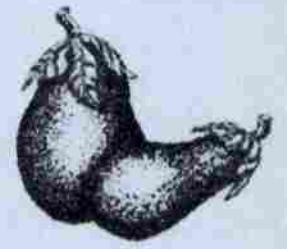
2000) y berenjenas Black Nite (Rodríguez y col. 2001) entre otros. El inconveniente surgido fue la aparición de desarrollo fúngico en los extremos del cáliz. Para ello se ensayó la inmersión de los frutos en una solución 1000 ppm del fungicida procloraz previo a su empacado con AMP, siendo este tratamiento muy efectivo dado que logró eliminar el desarrollo fúngico durante el tiempo estudiado.

Los tratamientos con MJ han sido utilizados para retardar el daño por frío en mango (González-Aguilar y col., 2000), zucchini (Wang y Buta, 1994), rábano (Wang, 1998) y pimiento mínimamente procesado (Buta y Moline, 1998) entre otros. En el presente trabajo, se ensayaron distintas concentraciones y modalidades de empleo del MJ previo al empacado de los frutos en AMP. Resultó seleccionada la modalidad de inmersión en una solución  $10^{-5}M$  de MJ, dado que con esta combinación se logró retardar un 10% el daño por frío de las berenjenas respecto de los frutos empacados sólo en AMP. Este hecho se evidenció por los menores valores de ID y los mayores valores de  $L_0$  y firmeza. Este tratamiento produjo un menor desarrollo fúngico, incluso cuando los frutos tratados fueron transferidos a 20°C por 48 h, respecto de los frutos empacados solamente en AMP. La composición de la atmósfera no fue prácticamente alterada en empaques con frutos tratados respecto de aquellos sin tratamiento.

En los últimos años se ha señalado que el uso de tratamientos térmicos con alta temperatura aumentan la tolerancia al daño por frío (Porat y col., 2000; Lurie y Klein, 1991; Wang, 1994b). En el presente trabajo de Tesis, se analizaron distintos tiempos y temperaturas de exposición en aire seco previo al empacado en AMP, resultando elegido el tratamiento de 40°C por 2 h, ya que retardó no sólo el daño por frío sino también el desarrollo fúngico sobre el cáliz de los frutos. En frutos tratados térmicamente y empacados en AMP se obtuvieron valores de velocidad en la evolución de ID y del pardeamiento de la pulpa de un 19 y 15% menor, respectivamente, en relación a los frutos control o empacados sólo en AMP. Si comparamos el desarrollo del daño por frío con lo observado en frutos almacenados con la película LDPE perforada, veremos que el TT+AMP fue el más efectivo en retardar los síntomas de daño ya que logró un valor de velocidad 30% menor, mientras que el tratamiento de MJ+AMP alcanzó un valor 23%

---

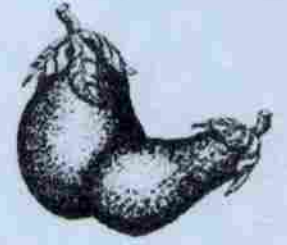
menor y el empaçado en AMP un 15% más bajo. En frutos tratados térmicamente, también se observó una menor pérdida de electrolitos y mayor firmeza. La composición de la atmósfera de empaques conteniendo frutos tratados térmicamente fue prácticamente similar a aquella lograda por frutos control y alcanzó un 11% de O<sub>2</sub> y 2% de CO<sub>2</sub>. El contenido de etileno interno aumentó en los primeros días de almacenamiento y hasta que el daño por frío fue notorio, siendo esto más pronunciado en frutos tratados que en frutos control. La actividad PPO en los frutos tratados térmicamente y expuestos a 0°C fue mayor que en los frutos control. Dicha actividad fue alta mientras la pulpa de los frutos no presentó desarrollo de pardeamiento, mientras que hacia el final del almacenamiento disminuyó en frutos tratados y se mantuvo constante en frutos control. Leja y col. (2003) hallaron que luego del almacenamiento refrigerado de manzanas, la actividad PPO disminuía. En nuestro trabajo, la actividad POD también fue superior en frutos tratados respecto de los frutos control, y así el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado en las células pudo haber sido atrapada por esta enzima. Lurie y col (1997) también hallaron un aumento de la actividad POD en tomates frente al tratamiento térmico. Tal vez la menor evidencia de daño observada en las berenjenas tratadas esté relacionada con el hecho de que, en ellos, los mecanismos de defensa ante el estrés por exposición a alta y posterior baja temperatura se podrían hallar más activos que en los frutos control (Saltveit, 1991; Lafuente y col., 1991; Lurie, 1998a y b).



# ***Conclusiones generales***

- 
- En berenjenas Money Maker N°2 se observó un incremento lineal de los síntomas de daño por frío con el tiempo de almacenamiento. La velocidad de desarrollo del daño fue 0,264 ( $r = 0,999$ ) a 0°C y 0,137 ( $r = 0,992$ ) a 5°C.
  - La manifestación del daño por frío se observó a través de la pérdida de brillo superficial, decoloración de la piel de la zona debajo del cáliz, pardeamiento en semillas y pulpa, aparición de zonas punteadas y desarrollo de escaldaduras en la piel de todo el fruto.
  - Por microscopía electrónica se observó la evolución del daño por frío a 0°C, en principio, como disminución de la densidad de laminilla media, aparición de espacios intercelulares y contracción de la membrana plasmática respecto de la pared celular; cuando el daño fue muy avanzado se observó ruptura de tonoplasto, pared celular vesiculada e incluso ruptura celular.
  - A 0°C, el contenido de ACC se incrementó luego de las 5 h de almacenamiento, mientras que el contenido de etileno interno lo hizo luego de las 24 h y el de MACC luego de 2 días.
  - Los niveles de etileno, ACC y MACC fueron altos frente al almacenamiento a 0°C respecto del valor inicial, hasta que se observó un avance pronunciado de los síntomas de daño por frío evidenciado por la gran pérdida de electrolitos y los altos valores de ID.
  - La actividad *in-vivo* de ACCo registró un continuo descenso a lo largo del almacenamiento a 0°C.
  - El contenido de antocianinas fue mayor en zona centro respecto de zona cáliz.
  - El almacenamiento a 0 y 5°C causó variaciones en el contenido de antocianinas en ambas zonas del fruto (centro y cáliz), mientras que el almacenamiento a 10°C tuvo poca incidencia.

- 
- Para la zona cáliz, la disminución en los valores de  $Cr^*$  a  $0^{\circ}C$  se relacionó con una disminución en el contenido de antocianinas.
  - Para la zona cáliz un aumento en los valores de  $b^*$  a  $0^{\circ}C$  estuvo asociado a una disminución en el contenido de antocianinas y a un aumento en el desarrollo de escaldaduras. Esto también se vio reflejado en los valores de  $L^*$  y Hue.
  - A  $0^{\circ}C$ , la actividad específica de ambas fracciones de PPO disminuyó cuando la pulpa de los frutos presentó desarrollo de pardeamiento.
  - En esta variedad de berenjenas, existe una correlación lineal entre la actividad de PPO soluble a  $0^{\circ}C$  y el valor de  $L_0$  ( $r = 0,991$ ;  $p = 0,009$ ).
  - El empaquetamiento en AMP, empleando la película PD941, retardó un 15% la evolución del daño por frío de las berenjenas respecto de aquéllas empacadas en LDPE perforada, evidenciado por los valores de ID y  $L_0$ .
  - El tratamiento con procloraz 1000 ppm y posterior empacado en AMP provocó una inhibición del desarrollo de hongos en el cáliz de los frutos almacenados a  $0^{\circ}C$  por 14 días y a  $10^{\circ}C$  por 23 días, pero no una disminución de los síntomas de daño por frío.
  - El tratamiento de los frutos con MJ  $10^5M$  y posterior empacado en AMP con la película PD941 causó un leve retardo (10%) de los síntomas de daño por frío de los frutos frente a aquéllos empacados sólo en AMP.
  - Las berenjenas tratadas térmicamente a  $40^{\circ}C$  por 2h y luego empacadas en AMP con la película PD941 mostraron una menor evolución (19%) del desarrollo de daño por frío respecto de los frutos empacados sólo en AMP, hecho evidenciado por los valores de ID,  $L_0$  y pérdida de electrolitos.
  - Los frutos tratados con MJ  $10^5M$  por inmersión y térmicamente a  $40^{\circ}C$  por 2h, previo al empacado en AMP, mostraron una reducción del desarrollo del daño por frío de un 23 y 30%, respectivamente, en relación a los frutos empacados con la película LDPE perforada.



## ***Bibliografía***



- 
1. Adamicki, F. 1984. Effects of storage temperature and wrapping on the keeping quality of cucumber fruits. *Acta Hort.* 156: 269-272.
  2. Adams, D.O. y Yang, S.F. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 170-174.
  3. Anderson, M.D., Prasad, T.K. y Stewart, C.R. 1995. Changes in isoenzyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1257.
  4. Anónimo. 2000. Eggplant. Información suministrada por la Universidad del Estado de Oregon, Corvallis, USA. ([www.orst.edu/dept/nwrec/eggplant.html](http://www.orst.edu/dept/nwrec/eggplant.html)).
  5. Anónimo. 2001. The eggplant fruit. Information Provider from Cooperative Extension, Institute Of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, USA. ([www.ianr.unl.edu/pubs/horticulture/g603.htm](http://www.ianr.unl.edu/pubs/horticulture/g603.htm)).
  6. Anónimo. 2002 a. El cultivo de la berenjena. Publicación actualizada de Infoagro. ([www.infoagro.com/hortalizas/berenjena](http://www.infoagro.com/hortalizas/berenjena)).
  7. Anónimo. 2002 b. Tecnología del envasado en atmósferas modificadas. Publicación actualizada de Infoagro. ([www.infoagro.com/industria\\_auxiliar/envasado.asp](http://www.infoagro.com/industria_auxiliar/envasado.asp)).
  8. Arogba, S.S., Ajiboye, O.L., Ugboko, L.A. Essienette, S.Y. y Afolabi, P.O. 1998. Properties of polyphenol oxidase in mango (*mangifera indica*) kernel. *J. Sci. Food Agric.* 77: 459-462.
  9. Barkai-Golan, R y Phillips, D.J. 1991. Postharvest heat treatments of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Dis.* 75: 1085-1089.
  10. Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. y Mayer, A.M. 1977. *J Sci, Food Agric.* 28: 545.
  11. Ben-Yehoshua, S., Kobilier, I. y Shapiro, B. 1981. Effects of cooling versus seal-packaging with high-density polyethylene on keeping qualities of various citrus cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106: 536-540.

- 
12. Bernstam, V.A. 1978. Heat effects on protein biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 25-46.
  13. Biggs, M.S. Woodson, W.R. y Handa, A.K. 1988. Biochemical basis of high temperature inhibition of ethylene biosynthesis in ripening tomato fruits. *Physiol. Plant.* 72: 572-578.
  14. Bleecker, A.B. y Kende, H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 1-18.
  15. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
  16. Brovelli, E.A., Brecht, J.K y Sherman, W.B. 1998. Anatomical and physiological responses of melting and nonmelting-flesh peaches to postharvest chilling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(4): 668-674.
  17. Burg, S.P. 1962. The physiology of ethylene formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 13: 265-302.
  18. Burg, S.P. y Thimann, K.V. 1959. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 45: 335-344.
  19. Buta, J.G. y Moline, H.E. 1998. Methyl jasmonate extends shelf life and reduces microbial contamination of fresh-cut celery and peppers. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1253-1256.
  20. Cantwell, M. y Suslow, T.V. 1999. Indicadores básicos del manejo poscosecha de berenjena. Departamento de Productos Vegetales. Universidad de California, Davis, USA. ([www.postharvest.ucdavis.edu/produce/producefacts/veg/eggplant.shtml](http://www.postharvest.ucdavis.edu/produce/producefacts/veg/eggplant.shtml)).
  21. Chan, H.T., Tam, S.Y.T. y Seo, S.T. 1981. Papaya polygalacturonase and its role in thermally injured ripening fruit. *J. Food Sci.* 46: 190-197.

- 
22. Chazarra S, Cabanes J, Escribano J y García Carmona F. 1996. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44: 984-988.
  23. Cheng, G.W. y Crisosto, C.H. 1995. Browning potencial, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 120: 835-838.
  24. Cheng, T.S., Floros, J.D., Shewfelt, R.L. y Chang, C.J. 1988. The effect of high-temperature stress on ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *J. Plant Physiol.* 132: 459-464.
  25. Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R. y Añón, M.C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2596-2601.
  26. Connor, A.M., Luby, J.J., Hancock, J.K., Berkheimer, S. y Hanson, E.J. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *J. Agric. Food Chem.* 50: 893-898.
  27. Corbineau, F., Bogatek, R., Radice, S., Picard, M. A. y Come, D. 1997. Changes in *in vivo* and *in vitro* ACC oxidase activities during chilling and subsequent warming as exemplified by *Vigna Radiata* seedlings. En *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Kanellis, A.K., Chang, C., Kende, H. y Grierson, D. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pág. 275-281.
  28. Coseteng, M.Y. y Lee, C.Y. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52(4): 985-989.
  29. Couey, H. M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScience.* 24: 198-202.
  30. Czapski, J., Horbowicz, M. y Saniewski, M. 1992. The effect of methyl jasmonate on free fatty acids content in ripening tomato fruits. *Biol. Plant.* 34: 71-76.

- 
31. Das, J.R., Bhat, S.G. y Gowda, L.R. (1997) Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the Kew cultivar of indian pineapple fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2031-2035.
  32. Demole, E., Lederer, E. Mercier, D. 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta.* 45: 675-685.
  33. Devlieghere, F., Jacxsens, L y Debevere, J. 2000. Modified atmosphere packaging: state of the art. Review del Laboratorio de Food Microbiology and Food Preservation, Department of Food Technology and Nutrition, University of Ghent, Belgium (<http://allserv.rug.ac.be/~pprovijn>).
  34. Díaz-Pérez, J.C. 1997. Transpiration rates in eggplant fruit as affected by fruit and calix size. *Postharvest Biol. Technology*, 13: 45-49.
  35. Ding, C., Chachin, K., Ueda, Y. y Imahori, Y. 1998. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4144-4149.
  36. Dunlap, J.R., Linge, S.E. y Lester, G.E. 1990. Ethylene production in netted muskmelon subjected to postharvest heating and refrigerated storage. *HortScience.* 25: 207-209.
  37. Escribano, J., Cabanes, J. y García Carmona, F. 1997. Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Chem.* 73: 34-38.
  38. Esteban, R.M., Mollá, E., Villarroya, B. y Lopez-Andreu, F.J. 1989a. Physical alteration in eggplant fruits during storage at different temperatures. *J.Fd. Sci. Technol.* 26 (6): 301-303.
  39. Esteban, R.M., Mollá, E., Villarroya, M.B. y López-Andréu, F.J. 1989b. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during storage. *Scientia Horticulturae.* 41: 19-25.

- 
40. Fan, X. y Mattheis, J.P. 1999. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. *J. Agr. Food Chem.* 47: 2847-2853.
  41. Fan, X., Mattheis, J.P., Fellman, J.K. y Patterson, M.E. 1997. Effect of methyl jasmonate on ethylene and volatile production by summered apples depends on fruit development stage. *J. Agr. Food Chem.* 45: 208-211.
  42. Farmer, E.E. 1994. Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1423-1437.
  43. Ferguson, I.B., Lurie, S. y Bowen, J.H. 1994. Protein synthesis and breakdown during heat shock of cultured pear (*Pyrus communis* L.) cells. *Plant Physiol.* 104: 1429-1437.
  44. Ferguson, I.B., Ben-Yehoshua, S., Mitcham, E.J., McDonald, R.E. y Lurie, S. 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. *Postharvest Biol. Technology.* 21:1-6.
  45. Fidler, J.C. - North, C.J. 1967. *J. Hort. Sci.*, 42: 189.
  46. Fidler, J.C.(1968). Recent Advances in Food Science (Vol. 4), En: *Low Temperature Biology of Foodstuffs*. Hawthorn, J, (ed), Pergamon Press Ltd. pág. 271-283.
  47. Field, R.J. 1984. The effect of temperature on ethylene production by plant tissue. En: *Ethylene and Plant Development*, Roberts, J.A., Tucker, G.A. (eds), Butterworths, Londres. pág: 47-69.
  48. Florissen, P., Ekman, J.S., Blumenthal, C., MaGlasson, W.B., Conroy, J y Holdorf, P. 1996. The effects of short heat treatments on the induction of chilling injury in avocado fruti (*Persea americana* Mill). *Postharvest Biol. Technol.* 8: 129-141.
  49. Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. y Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.
  50. Friend, J. y Rhodes, M.J.C. eds. 1981. *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Academic Press Inc. (Londres) Ltd., pág: 6, 91, 93, 94, 231.

- 
51. Fukushima, H., Nagao, S., y Nozawa, Y. 1979. Further evidence for changes in the level of palmitoyl-CoA desaturase during thermal adaptation in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 572: 178-182.
  52. Gane, R. 1934. Production of ethylene by some ripening fruit. *Nature*. 134: 1008.
  53. García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. 1999. Edible starch films and coatings characterization: Scanning electron microscopy, water vapor and gas permeabilities. *Scanning*. 21: 348-353.
  54. Gauillard, F. y Richard-Forget, F. 1997. Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L, cv Williams): activation, purification and some properties. *J. Sci. Food Agric.* 74: 49-56.
  55. Gerasopoulos, D. y Richardson, D.G. 1997. Storage-temperature-dependent time separation of softening and chlorophyll loss from the autocatalytic ethylene pathway and other ripening events of "Anjou" pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(5): 680-685.
  56. Goldschmidt, E.E. 1980. Pigment changes associated with fruit maturation and their control (cap. 9). En: *Senescence in Plants*, K.V. Thimann (ed),. CRC Press, Boca Raton, FL, pág: 207-217.
  57. González-Aguilar, G.A., Fortiz, J., Cruz, R., Baez, R y Wang, C.Y. 2000. Methyl jasmonate reduces chilling injury and maintains postharvest quality of mango fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48: 515-519.
  58. Gonzalez, E.M., Begoña de Ancos, y Cano, M.P. 2000. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5459-5464.
  59. Grace, S.C., Logan, B.A. y Adams, W.W. 1998. III. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell and Environment*. 2: 513-521.
  60. Grisebach, H. 1979. En *Biochemistry of plant phenolics. Recent advances in phytochemistry*, (ed), Plenum Press, Nueva York y Londres, Vol 12: 221-248.
-

- 
61. Harborne, J.B. 1988. *Introduction to ecological biochemistry*. Tercera edición. Academic Press, New York.
  62. Hardenburg, R.E. 1971. Effect of in-package environment on keeping quality of fruits and vegetables. *HortScience*. 6: 198-201.
  63. Hardenburg, R.E., Watada, A.E. y Wang, C.Y. 1986. The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks. U.S. Dept. Agr. Agr. Hdbk. 66 Washington, D.C.
  64. Harel, E y Mayer, A.M. 1970. The use of a fungal pectate lyase in the purification of laccasa from peaches. *Phytochemistry*. 9: 2447-2452.
  65. Hatton, T.T. 1990. Reduction of chilling injury with temperature manipulation. En: *Chilling injury of horticultural crops*. Wang, C.Y. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fl. pág: 269-280.
  66. Hobson, G.E. 1981. The short-term storage of tomato fruit. *J. Hort. Sci*. 56: 363-368.
  67. Hobson, G.E. 1987. Low-temperature injury and the storage of ripening tomatoes. *J. Hort. Sci*. 62: 55-62.
  68. Hoffman, N.E. y Yang, S.F., 1980, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 105:492-495.
  69. Hoffman, N. E., Yang, S. F., McKeon, T. 1982. Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as a mayor conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 104, 765-770.
  70. Hoshino, T., Matsumoto, U. y Goto, T. 1981. Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemisry* 20: 1971-1976.
  71. Hulme, A.C. 1970. *The Biochemistry of Fruits and their Products* - Academic Press. Londres y New York. Pág: 292.
  72. Ilker, R., Breidenbach, R.W y Lyons, J.M. 1979. Sequence of ultrastructural changes in tomato cptyledons during short periods of chilling, En: *Low temperature stress in*

---

*crop plants: The role of the membrane.* J.M. Lyons, D. Graham y J.K. raison (eds.), Academic, New York. pág: 97-113.

73. Ilker, R., Waring, A.J., Lyons, J.M. y Breidenbach, R.W. 1976. The cytological responses of tomato-deedling cotyledons to chilling and the influence of membrane modifications upon these responses. *Protoplasma*, 90: 229-252.
74. Jacobi, K. Giles, E., MacRae, E. y Wegrzyn, T. 1995. Conditioning "Kesington" mango with hot air alleviates hot water disinfestation injuries. *HortScience* 30: 562-565.
75. Jobling, J. y McGlasson, W.B. 1995. Chilling at 0°C in air induces ethylene production in Fuji and Lady Williams apples. *Aust. J. Exp. Agric.* 35: 651-655.
76. Jones, H.G. 1981. Carbon dioxide exchange of developing apple fruits. *J. Exp. Bot.* 321: 1203-1210.
77. Kader, A.A., Zagory, D. and Kerbel, E.L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 1-30.
78. Kan, B.G. y Burg, S.P. 1972. Involvement of ethylene in phytochrome-mediated carotenoid synthesis. *Plant Physiol.* 49: 631-633.
79. Kanabus, J., Pikaad, C.S. y Cherry, J.H. 1984. Heat shock proteins in tobacco cell suspension during growth cycle. *Plant Physiol.* 75: 639-644.
80. Kato, C., Uritani, I. Saijo, R. y Takeo, T. 1976. *Plant Cell Physiol.* 17: 1045
81. Kende, H. (2001). Hormone Response Mutants. A Plethora of Surprises. *Plant Physiol.* 125: 81-84
82. Kimball, S.L. y Salisbury. 1973. Ultrastructural changes of plants exposed to low temperatures. *Amer. J. Bot.* 60: 1028-1033.
83. Klein, J.D., Lurie, S. y Ben-Aire, R. 1990. Quality and cell wall component of Anna and Granny Smith apple treated with heat, calcium and ethylene. *J.Am. Soc. Hort.Sci.* 115: 954-958



- 
84. Klein, L.D. y Lurie, S. 1990. Prestorage heat treatment as a means of improving poststorage quality of apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 15: 255-259.
  85. Kozukue, N., Kozukue, E. y 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: 51-59.
  86. Lafuente, M.T., Belver, A. Guye, M.G. y Saltveit, M.E. Jr. 1991 Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 95: 443-449.
  87. Lafuente, M.T. y Martínez-Tellez, M.A. 1997. Effect of the high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled "Fortune" mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150: 674-678.
  88. Larrigaudiere, C., Lentheric, I. y Vendrell, M. 1998. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled-atmosphere stored pears. *J. Sci. Food Agric.* 78: 232-236.
  89. Lederman, I.E., Zauberman, G., Weksler, A., Rot, I. y Fuchs, Y. 1997. Ethylene-forming capacity during cold storage and chilling injury development in "Keitt" mango fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 10: 107-112.
  90. Leja, M., Mareczek, A. Y Ben, J. 2003. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chem.* 80: 303-307.
  91. Lelievre, J.M., Tichit, L., Fillion, L., Larrigaudiere, C., Vendrell, M. y Pech, J.C. 1995. Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase protein in Granny Smith apples. *Postharvest Biol. Technol.* 5: 11-17.
  92. Leng, P. 1998. Relationship between the anthocyanin content in shoot bark and cold resistance of several apple varieties. En: *Physiology and molecular biology of fruit trees*. Zhang, D.P., Leng, P. (eds). China Agricultural University Press, Beijing., pág: 67-70.

- 
93. Leng, P. y Qi, J.X. 2003. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Scientia Horticulturae*. 97: 27-39.
  94. Leng, P., Itamura, H. y Yamamura, H. 1993. Freezing tolerance of several *Diospyros* species and kaki cultivars as related to anthocyanin formation. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 61: 795-804. (en japonés con el abstract en inglés).
  95. Leng, P., Itamura, H. y Yamamura, H. 1995. Changes of phenylalanine ammonialyase activity in twig tissues of two *Diospyros* during cold acclimation. *Environ. Control. Biol.* 33: 43-48. (en japonés con el abstract en inglés).
  96. Leshem, Y.Y, Halevy, A.H y Frenkel, C. (eds) 1986. *Processes and Control of Plant Senescence*. Elsevier Sc. Publishers B.V. pág: 36, 178, 180, 168, 162-199.
  97. Li, H. y Yu, T. 2000. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *J. Sci. Food Agric.* 81: 269-274.
  98. Lieberman, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 30: 533-591.
  99. Lieberman, M., Craft, C.C., Audia, W.V. y Wilcox, M.S. 1958. Biochemical studies of chilling injury in sweet potatoes. *Plant Physiol.* 33: 307-311.
  100. Lin, W.C., Hall, J.W. y Saltveit, M.E. Jr., 1993. Ripening stage affects the chilling sensitivity of greenhouse-grown peppers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118 (6): 791-795.
  101. Lineweaver, H. y Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-661.
  102. Lizada, M.C.C. y Yang, S.F. 1979 . A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem.* 100: 140-145.
  103. Loaiza-Velarde, J., Tomás-Barberá, F.A. y Saltveit, M.E. 1997. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on Wound-induced phenolic metabolism un iceberg lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(6): 873-877.

- 
104. López-Andréu, F.J, Mollá, E, Fernández, M. y Esteban, R.M. 1988. Conservación en frío de berenjenas. Modificaciones de su calidad. *Alimentaria*, N° 192: 31-36.
105. Lurie, S. 1998a. Postharvest heat treatments of horticultural crops. *Hortic. Rev.* 22: 91-121.
106. Lurie, S. 1998b. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 14: 257-269.
107. Lurie, S., Fallik, E., Handros, A. Y Sapira, R. 1997. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 50(3): 141-149.
108. Lurie, S., Fallik, E. y Klein, J.D. 1996. The effect of heat treatment on apple epicuticular wax and calcium uptake. *Postharvest Biol. Technol.* 8: 271-277.
109. Lurie, S. y Klein, J.D., 1990. Heat treatment of ripening apples. Differential effects on physiology and biochemistry. *Physiol. Plant.* 78: 191-186.
110. Lurie, S. y Klein, J.D., 1991. Acquisition of low-temperature tolerance in tomatoes by exposure to high-temperature stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116: 1007-1012.
111. Lurie, S., Othman, S. y Borochoy, A. 1995. Effects of heat treatment on plasma membrane of apple fruit. *Postharvest. Biol. Technol.* 5: 29-38.
112. Luza, J.G., Gorsel, R., Polito, V.S. y Kader, A.A. 1992. Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(1): 114-118
113. Lyons, J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24: 445-466.
114. Lyons, J.M. 1979 . En: *Low Temperature Stress in Crop Plants*, Lyons, J.M. - Graham, D. - Raison, J.K. (eds), Academic Press. Pág: 1-24.
115. Mallick, N y Mohn, F.H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.* 157: 183-193.
116. Mangione, J.L. y Sánchez, M.G., 1999. Cultivo y manejo poscosecha de berenjena. Area de Inspección de frutas y hortalizas. Laboratorio de Fitopatología. Mercado Central de Buenos Aires.
-

---

(www.mercadocentral.com.ar/site2001/tecnicas/berenjena.zip)

117. Marangoni, A.G., Smith, A.K., Yada, R.Y, y Stanley, D.W. 1989. Ultraestructural changes associated with chilling injury in mature-green tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(6): 958-962
118. Marques, L., Fleuriet, A. y Macheix, J.J. 1995. Fruit polyphenol oxidases. *American Chemical Society*. Pag: 90-102
119. Matsuzoe, N, Yamaguchi, M., Kawanobu, S., Watanabe, Y., Higashi, H. y Sakata, Y. 1999 . Effect of dark treatment of the eggplant on fruit skin color and its anthocyanin component. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68 (1): 138-145.
120. Mayer, A.M. y Harel, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*. 18:193-215.
121. Mayer, A.M. y Harel, E. 1981. Polyphenol oxidases in frutis: Changes during ripening. En: *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Friend, J. Y Rhodes, M.J.C. (eds), Academic Press, Londres. Pág: 161-180.
122. Mayles, B.A. 1975. *Chem. Abst.* 83.128494u
123. McDonald, R.E., Miller, W.R. y McCollum. 1990. Reducing chilling injury and decay of grapefruit by fungicides applied at high temperatures. *HortScience*. 25: 1084.
124. McHugh, T.H. y Krochta, J.M. 1994. Permeability properties of edible films. En *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality* (Eds. Krochta, J-M-, Baldwin, E.A. y Nisperos-Carriedo, M.) Technomic Publishing Co, Inc, Lancaster, Pa. 139-187.
125. McMurchie, E.J., McGlasson, W.B. y Eaks, I.L. 1972. Treatments of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*. 237: 235-236.
126. Meir, S. Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E. y Fuchs, Y. 1996. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit and bell pepper by methyl jasmonate. *Can. J. Bot.* 74: 870-874.

- 
127. Mencarelli, F. 1987. Effect of high CO<sub>2</sub> atmospheres on stored zucchini squash. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 985-988.
128. Miersch, O.A., Meyer, S. Vorkefeld, S. y Sembdner, G. 1986. Occurrence of (+)-7-isojasmonic acid in *Vicia faba* L. and its biological activity. *J. Plant Growth Regulat.* 5: 91-100.
129. Moor, B.M. y Flurkey, W.H. 1990. Sodium dodecyl sulphate activation of a plant polyphenoloxidase, *J. Biol. Chem.*, 265: 4982-4988.
130. Murata, M., Tsurutani, M., Hagiwara, S. y Homma, S. 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(9): 1495-1499.
131. Murata, N. y Nishiyama, Y. 1998. Molecular mechanisms of the low-temperature tolerance of the photosynthetic machinery. En: *Stress Responses of Photosynthetic Organisms*, Satoh, K y Murata, N. (eds), Elsevier Science B. V., Capítulo 7.
132. Murata, T. 1989. Relation of chilling stress to membrane permeability. En: *Chilling Injury of Horticultural Crops*. C. Y. Wang (Ed). CRC Press, Boca Raton, Fla., pp. 201-209.
133. Murphy, C. y Wilson, J.M. 1981. Ultrastructural features of chilling injury in *Episcia reptans*. *Plant Cell Environ.* 4: 261-265.
134. Niki, T., Yoshida, S. y Sakai, A. 1978. Studies on chilling injury in plant cells: I. Ultrastructural changes associated with chilling injury in callus tissues of *Cornus stolonifera*. *Plant Cell Physiol.* 19: 139-148.
135. Niki, T., Yoshida, S. y Sakai, A. 1979. Studies on chilling injury in plant cells: II. Ultrastructural changes in cells rewarmed at 26°C after chilling treatment. *Plant Cell Physiol.* 20: 899-908.
136. Noda, Y., Kaneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A. Y Packer, L. 1998. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 102: 175-187.
-

- 
137. Nothmann, J., Rylski, I. y Spigelman, M. 1975. Color and variations in color intensity of fruit of eggplant cultivars. *Scientia Horticulturae*. 4: 191-197.
138. Nover, L. Neumann, D. y Scharf, K. 1989. Heat shock and other stress response systems of plants. Springer-Verlag, New York.
139. Otero, L., Solas, M.T. y Sanz, P.D. 1998. Contrasting effects of high-pressure-assisted freezing and conventional air-freezing on eggplant tissue microstructure. *Z. Lebensm Unters Forsch A*. 206: 338-342.
140. Palma, T., Marangoni, A.G. y Stanley, D.W. 1995. Environmental stress affect tomato microsomal membrane function differently than natural ripening and senescence. *Postharvest Biol. Technol.* 6: 257-273.
141. Pantastico, E.B. (ed) 1979. Daño por frío (cap. 17). En: *Fisiología de la postrecolección, manejo y utilización de frutas y hortalizas tropicales y subtropicales*. Compañía Editorial Continental S. A - México. Pág: 407-434.
142. Parkin, K.L., Marangoni, A., Jackman, R.L., Yada, R.Y. y Stanley, D.W. 1989. Chilling injury. A review of possible mechanisms. *J. Food Biochemistry*. 13: 127-153.
143. Parsell, D.A. y Linnquist, S. 1993. The function of heat shock proteins in stress tolerance degradation and reactivation of proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27: 437-496.
144. Parthier, B. 1991. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions. *Bot. Acta*. 104: 446-454.
145. Paull, R.E. y Chen N.J. 2000. Heat treatment and fruti ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 21-37.
146. Peiser, G., López-Gálvez, G. Cantwell, M. y Saltveit, M.E. 1998. Phenylalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 14: 171-177.
147. Pentzer, W.T. y Heinze, P.H., 1954. Postharvest physiology of fruits and vegetables. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 5: 205-224.
-

- 
148. Perez, A.G., Sanz, C. Olías, R. y Olías, J.M. 1997. Effect of methyl jasmonate on *in vitro* strawberries ripening. *J. Agric. Food Chem.* 24: 3733-3737.
149. Perez-Gilabert, M. y Garcia-Carmona, F. 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 48: 695-700.
150. Pesis, E., Aharoni, D., Aharon, Z., Ben-Arie, R., Aharoni, N. y Fuchs Y. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 19: 93-101.
151. Platt-Aloia, K.A. y Thomson, W.W. 1976. An ultrastructural study of two forms of chilling-induced injury to the rind of grapefruit (*Citrus paradisi*, Macfed). *Cryobiology.* 13: 95-106.
152. Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben-Yehoshua, S. y Lurie, S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of "Star Ruby" grapefruit. *Postharvest Biol. Technol.* 18: 159-165.
153. Porter, A.J.R., Borlakoglu, J.T. y John, P. 1986. Activity of the ethylene forming enzyme in relation to plant cell structure and organization. *J. Plant Physiol.* 125: 207-216.
154. Prasad, T.K., Anderson, M.D. y Stewart, C.R. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105: 619-627.
155. Publicación de Estadísticas y Censos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA), 1999.
156. Revista Abriendo Surcos. 1999. Edición 072, Agosto. Revista mensual producida y editada por Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, México. Pág. 3-25.
157. Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, L.R., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E. y Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science.* 160: 315-321.
-

- 
158. Robert, C., Rouch, C., Richard-Forget, F., Pabion, M. y Cadet, F. 1996. Partial purification and physicochemical characterization of *Acanthophoenix rubra* polyphenol oxidase. *Plant Physiol. Biochem.* 34(3): 369-375.
159. Rodriguez, S., López, B. Y Chaves, A.R. 2001. Effect of different treatments on the evolution of polyamines during refrigerated storage of eggplants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4700-4705.
160. Sakamura, S., Watanabe, S y Obata, Y. 1965. Anthocyanase and anthocyanin occurring in eggplant (*Solanum melongena*, L.)-Part III: Oxidative decolorization of the anthocyanin by Polyphenol Oxidase. *Agr. Biol. Chem.* 29 (3): 181-190.
161. Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. Editores de *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, México. Pag: 356-358.
162. Saltveit, M.E. Jr. 1991. Prior temperature exposure affects subsequent chilling sensitivity. *Physiol. Plant.* 82: 529-536.
163. Salunkhe, D.K. y Desai, B.B. (eds) 1984. Eggplant (cap. 4). En: *Postharvest Biotechnology of Vegetables*, Vol. II, Pág: 39-47.
164. Saniewski, M., Czapski, J., Nowacki, J. y Lange, E. 1987. The effect of methyljasmonate on ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production in apple fruits. *Biol. Plant.* 2: 199-203.
165. Schiffmann-Nadel, M., Chalutz, E., Waks, J. y Dagan, M. 1975. Reduction of chilling injury in grapefruit by thiabendazole and benomyl during long-term storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 100: 270-272.
166. Schiffmann-Nadel, M., Chalutz, E., Waks, J. y Lattar, F.S. 1972. Reduction of pitting of grapefruit by thiabendazole during long-term cold storage. *HortScience.* 7: 394-395.
167. Schirra, M. y Ben-Yehoshua, S. 1999. Heat treatments: a possible new technology in citrus handling-challenges and prospects. En: *Advances in postharvest diseases and disorders of citrus fruit*, Schirra, M. (ed), Research Signpost, Trivandrum, pag: 133-147.
-



- 
168. Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Ben-Yehoshua, S. y Lurie, S. 2000. Chilling injury and residue uptake in cold-stored "Star Ruby" grapefruit following thiabendazole and imazalil dip treatments at 20 and 50°C. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 91-98.
169. Sembdner, G. Y Parthier, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589.
170. Serradell, M.A., Rozenfeld, P.A., Martínez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R. y Añón, M.C. 2000 Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and partial purification. *J. Sci. Food Agric.* 80:1421-1427.
171. Serrano, M., Martínez-Madrid, M. C., Pretel, M. T., Riquelme, F. y Romojaro, F. 1997. Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1668-1672.
172. Shatta, A. y El-Shamei, Z. 1999. Differentiation of eggplant (*Solanum melongena* L.) polyphenoloxidase, laccase and peroxidase using selective substrates and inhibitors. *Adv. Food Sci.* 21(3/4): 79-83.
173. Sherman, M y Ewing, E.E. 1983. Effects of temperature and low oxygen atmospheres on respiration, chip color, sugars and malate of stored potatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 129-133.
174. Shomer, I., Ben-Shalom, N. Harel, E. y Mayer, A.M. 1979. *Ann. Botany.* 44: 261-263
175. Sozzi, G.O., Cascone, O. y Frascina, A.A. 1996. Effect of a high temperature stress on endo- $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities during tomato fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 9: 49-63.
176. Stafford, H.A. 1990. *Flavonoid metabolism*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pág:
177. Taiz, L. y Zeiger, E. (eds). 1998. Stress Physiology (capítulo 25). En: *Plant physiology*, Segunda edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. Pág: 740-745.
-

- 
178. Temkin-Gorodeiski, N., Shapiro, B., Grinberg, S., Rosenberger, I. Y Fallik, E. 1993. Postharvest treatments to control eggplant deterioration during storage. *J. Hort. Sci.* 68(5): 689-693.
179. Thimann, K.V. (ed) 1980. The maturation and ripening of fruits (cap. 8). En: *Senescence in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL. pág: 157-205.
180. Timberlake, C.F. 1981. Anthocyanins in fruit and vegetables (cap. 12). En: *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Friend, J.-Rhodes, M.J.C. (eds), Academic Press Inc. (Londres) Ltd. Pág: 221-247.
181. Trejo-Gonzalez, A. y Soto-Valdez, H. 1991. Partial characterization of polyphenoloxidase extracted from "Anna" apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 (4): 672-675.
182. Trewavas, A. 1999. Le calcium, C'est la vie: Calcium makes waves. *Plant Physiol.* 120: 1-6.
183. Tsuda, T., Shiga, K. Ohshima, K., Kawakishi, S. y Osawa, T. 1996. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigment isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1033-1039.
184. Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S.W., Kawakishi, S. y Osawa, T. 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2407-2410.
185. Ueda, J. Kato, J., Yamane, H. y Takahashi, N. 1981. Inhibitory effect of methyl jasmonate and its related compounds on kinetin-induced retardation of oat leaf senescence. *Physiol Plant.* 52: 305-309.
186. Uritani, Y. 1978 . En *Postharvest Biology and Biotechnology*. Food and Nutrition Press, Inc. Westport, USA. pp: 136-160.
187. Vaughn. K.C., Lax, A.R. y Duke, S.O. 1988. *Physiol. Plant.* 72: 639-665
-

- 
188. Vick, B.A. y Zimmerman, D.C. 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75: 458-461.
189. Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620
190. Wang, C.Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience.* 17: 173-186.
191. Wang, C.Y. 1991. Effect of abscisic acid on chilling injury of zucchini squash. *J. Plant Growth Regul.* 10: 101-105.
192. Wang, C.Y., 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Hortic. Rev.* 15: 63-95.
193. Wang, C.Y., 1994a. Chilling injury of tropical horticultural commodities. *Hortscience,* 29(9): 986-989.
194. Wang, C.Y. 1994b. Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.* 4: 65-73.
195. Wang, C.Y. 1998. Methyl jasmonate inhibits postharvest sprouting and improves storage quality of radishes. *Postharvest Biol. Technol.* 14: 179-183.
196. Wang, C.Y. y Adams, D.O. 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus L.*). *Plant Physiol.* 69: 424-427.
197. Wang, C.Y. 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): 427-432.
198. Wang, C.Y. y Qi, L. 1997. Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers. *Postharvest Biol. and Technol.* 10: 195-200.
199. Wang, S.Y. y Stretch, A.W. 2001. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *J. Agric. Food Chem.* 49: 969-974.
-

- 
200. Williams, M.H., Bown, M.A., Vesk, M. y Brady, C. 1994. Effect of postharvest heat treatments on fruit quality, surface structure, and fungal disease of Valencia orange. *Aust. J. Exp. Agric.* 346: 1183-1190.
201. Wise, R.R., McWilliam, J.R. y Naylor, A.W. 1983. A comparative study of low-temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. *Plant Cell Environ.* 6: 525-535.
202. Woolf, A.B., Ball, S., Spooner, K.J., Lay-Yee, M., Ferguson, I.B., Watkins, C.B., Gunson, A. Y Forbes, S.K. 1997. Reduction of chilling injury in the sweet persimmon "Fuyu" during storage by dry air heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 11: 155-164.
203. Yamane, H., Sugawara, J., Suzuki, Y., Shimamura, E. y Takahashi, N.. 1980. Synthesis of jasmonic acid related compounds and their structure-activity relationships on the growth of rice seedlings. *Agric. Biol. Chcm.* 44: 2857-2864.
204. Yamane, H., Takahashi, N., Ueda, J. y Kato, J. 1981. Resolution of ( $\pm$ )-methyl jasmonate by high performance liquid chromatography and the inhibitory effect of (+)-enantiomer on the growth of rice seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 45: 1709-1711.
205. Yamasaki, H., Uefuji, H. Sakihama, Y. 1996. Bleaching of the red anthocyanin induced by super-oxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 332: 183-186.
206. Yang, S. F. y Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
207. Yang, S.F. 1981. En *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetales*, Friend, J.-Rhodes, M.J.C. (eds), Academic Press Inc. (Londres) Ltd. Pág: 89-106.
208. Yang, S.F. y Pratt, H.K. , 1978. En: *Biochemistry of Wound Plant Storage Tissues*, G. Kahl (ed), pág: 595-622.
209. Young, L.L., Reviere, R.D. y Cole, A.B. 1988. Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. *Food Technol.* 42(9): 64-66, 68-69.



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

DONACION..... BIBLIOGRAFIA 201  
 ▲.....  
 Fecha... 28-04-03  
 Inv. #..... Inv..... B. 57012

- 
210. Yu, Y.B. Adams, D.O. y Yang, S.F. 1980. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiol.* 66: 286-290.
211. Yue-Ming, J., Zauberman, G. y Fuchs, Y. 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extract from litchi pericarp. *Postharvest Biol. Technol.* 10: 221-228.