

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

**“Relación entre la
capacidad antioxidante
y el desarrollo del daño por frío
en pimientos.
Efecto de la radiación UV-C.”**

Tesis presentada para optar por el grado académico de
Magíster en Tecnología e Higiene de Alimentos

María José Andrade Cuvi

2008

La Plata - Argentina

El presente trabajo de Tesis para optar por el grado académico de
Magíster en Tecnología e Higiene de los Alimentos 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, CONICET)
bajo la dirección de la Dra. Alicia R. Chaves y
codirección de la Dra. Analía Concellón.

Para no olvidar que siempre quise ser un hombre bueno,
Para no dejar las cosas que de niño yo soñé,
Para andar por los caminos de este mundo sin temor
Y tener un lugar al que regresar,
Un lugar al que pertenecer...
Llevo un poco de Quito en mí.

Tierra de luz [R. Perotti.]

*A mis padres,
Gonzalo y Zailina*

Mi profundo agradecimiento

a ABBÁ,

Por permitirme vivir esta maravillosa experiencia en Argentina y haber puesto en mi camino a todas aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este período.

Por no darme todo lo que pedí sino sólo aquello que precisaba.

EN ARGENTINA:

Dra. Alicia Chaves, mi directora de tesis, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad.

Dra. Analía Concellón, mi codirectora de tesis, por enseñarme “tips” del trabajo en el laboratorio, por todo el apoyo durante el desarrollo de esta tesis en lo laboral y personal. Ser mi amiga y a veces mamá. Por escucharme. Por dejarme entrar en su familia. Por todo lo compartido dentro y fuera del instituto, alegrías y tristezas, calor y frío, viento y nieve... por sus consejos que los llevaré siempre conmigo. Por el trabajo en conjunto que hemos llevado, a pesar de la distancia, para la culminación de este trabajo... y los que están por venir!

María Laura Lemoine, por compartir las horas de laboratorio, las largas y amenas charlas y enseñarme casi, casi todo el vocabulario argentino.

Paula Conforti, por compartir las horas de laboratorio, los triunfos y derrotas de los ensayos, siempre con buen humor, por el asado... gracias!

Ariel Vicente, por su permanente disposición, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes en el laboratorio, durante el desarrollo de la escritura y revisión de este trabajo. Por su desinteresada ayuda, muchas gracias!!! ...no olvidaré que de vez en cuando apagabas mi computadora!

Las chicas de trigo (Natalia, Analía G. y Jimena), Joaquín y Eugenia, mis amigos que conocí en el laboratorio de vegetales, por todos los momentos compartidos y hacer más ameno el trabajo diario.

Ines Gattó-Bicaín, por las largas horas de HPLC, por apoyarnos en los momentos difíciles, por todo lo compartido dentro y fuera del CIDCA, siempre con una gran sonrisa.

Andrea Mora, mi compañera de habitación, por las largas charlas nocturnas, por hacer agradable la estadía en la pensión, buscar juntas el lado bueno de las cosas y salir adelante frente a los inconvenientes que se presentaron...

A las hermanitas Olga, Mariela y Justina en la ciudad de La Plata y la hermana Delsy (ahora en Venezuela) de la Congregación Canoneras de la Cruz, por hacerme sentir, cada sábado, cerca de casa, por estar siempre pendientes de mí y encomendarme en sus oraciones.

Inés y Luis, mis colegas y amigos ecuatorianos en La Plata, por compartir nuestros anhelos y añoranzas, por todo el apoyo y cariño.

EN ECUADOR:

A mi padres, Gonzalo y Zoilina,
De manera especial e infinita, sin su apoyo esto no hubiese sido posible. Por su ejemplo soy lo que soy. Por enseñarme a luchar por mis sueños y a querer profundamente a mi país.

A mi hermanito, Paúl,
Por apoyarme siempre, estar ahí como toda la vida, cuidándome y dándome ánimo en todo momento, por su ejemplo.

A Luis,
Por darme aliento para seguir adelante y contenerme en todo momento, darme su amor a pesar de la distancia y el tiempo que estuvimos lejos. Porque pude darme cuenta que los sueños y el amor no entienden de tiempo ni distancia.

A toda mi familia, por su apoyo constante, por estar siempre pendientes de mí, especialmente a mi prima Ivonne Paola, por las largas horas de "chat"... y seguir compartiendo nuestras cosas, apoyándonos como desde que éramos niñas; y a mi pequeña Michelle, por sus divertidas charlas, por contagiarme su alegría y compartir sus cosas conmigo.

A Carmenes (mi nana) y la pequeña Dafne, por su apoyo y preocupación constante.

A mis amigos:

Los de toda la vida, el Rider y el Esteban, por el apoyo, como siempre!
Al Edgar Paúl, al Gabo, Violeta (Pao), Silvana y Georgina, por su apoyo y cariño.
Mi mejor amiga, Lucy, por compartir nuestros sueños y aunque la vida nos ha llevado por caminos diferentes, estará siempre en mi corazón.

Septiembre, 2008
La Plata-Argentina

ABREVIATURAS

Δ OD	Diferencia de absorbancia
ADA	Acido dehidroascórbico
ADN	Acido desoxirribonucleico
APX	Ascorbato peroxidasa
ARN	Acido ribonucleico
AsA	Ácido ascórbico
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
Cr	Croma
DPF	Daño por frío
DPPH·	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC ₅₀	Concentración efectiva (50%)
EDTA	Acido etilendiamintetra-acético
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H°	Ángulo Hue
HR	Humedad relativa
HSP	Proteínas de shock térmico
ID	Índice de daño
K _m	Constante aparente de Michaelis Menten
L*	Luminosidad
LOX	Lipo oxigenasa
MDA	Malondialdehído
MDHA	Acido monodehidroascórbico
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NBT	Nitroblue tetrazolium
PA	Poder anti-radical
PL	Peroxidación lipídica
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonil
POX	Peroxidasa
PVPP	Polivinilpirrolidona
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Acido tricloroacético
UV-A	Radiación ultravioleta A
UV-B	Radiación ultravioleta B
UV-C	Radiación ultravioleta C
V _{máx}	Velocidad máxima

INDICE

Página

RESUMEN

OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

1 Generalidades del pimiento	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Propiedades y valor nutritivo	1
1.3 Tipos de pimiento	2
1.4 Producción y consumo	3
1.5 Cosecha	5
1.6 Almacenamiento poscosecha	6
1.7 El pimiento y el daño por frío (DPF)	7
1.8 Tecnologías poscosecha para reducir el daño por frío	7
2 Radiación ultravioleta	9
2.1 Efectos de la luz UV sobre los sistemas biológicos	10
2.2 Aplicaciones de la luz UV	12

CAPITULO I: EFECTO DE LA RADIACION UV-C SOBRE EL DESARROLLO DEL DAÑO POR FRIO

I.1 Introducción	14
1.1.1. Daño por frío en frutos y hortalizas	14
1.1.2. Fisiología del daño por frío en productos hortifrutícolas	15
1.1.3. Teoría de la alteración de proteínas	15
1.1.4. Teoría de la transición de fase	16
1.1.5. Teoría del estrés oxidativo	18
1.1.2 Daño por frío en pimiento	19
1.1.3 Control del daño por frío en pimiento	19
I.2 Objetivo	20
1.3 Materiales y Métodos	21
1.3.1 Material vegetal	21
1.3.2 Tratamiento con luz UV-C y selección de la dosis efectiva	21
1.3.3 Índice de daño por frío	22
1.3.4 Pérdida de peso	23
1.3.5 Color superficial	23
1.3.6 Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	23
1.3.7 Análisis estadístico	24
I.4 Resultados y Discusión	25
1.4.1 Selección de la dosis efectiva de UV-C	25

1.4.2	Efecto del tratamiento UV-C sobre el desarrollo del daño por frío	26
1.4.3	Efecto del tratamiento UV-C sobre la pérdida de peso	27
1.4.4	Efecto del tratamiento UV-C sobre el color superficial	28
1.4.5	Efecto del tratamiento UV-C sobre el contenido de TBARS	31
1.5	Conclusiones	33

CAPITULO II: EFECTO DE LA RADIACION UV-C SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

II.1	Introducción	34
II.1.1	Los radicales libres	34
II.1.1.1	Generación de radicales libres	34
II.1.2	Compuestos Antioxidantes	36
II.1.2.1	Compuestos fenólicos	37
II.1.2.2	Flavonoides	38
II.1.2.3	Acido ascórbico (AsA)	39
II.1.2.3.1	Ciclo de Halliwell-Asada	40
II.1.2.4	Acido dehidroascórbico (ADA)	41
II.2	Objetivo	42
II.3	Materiales y Métodos	43
II.3.1	Material vegetal	43
II.3.2	Tratamiento con luz UV-C	43
II.3.3	Contenido de fenoles y flavonoides	43
II.3.3.1	Preparación del extracto	43
II.3.3.2	Determinación del contenido de fenoles totales	43
II.3.3.3	Determinación del contenido de flavonoides	44
II.3.4	Contenido de Acido ascórbico (AsA) y Acido dehidroascórbico (ADA)	44
II.3.4.1	Extracción	44
II.3.4.2	Cuantificación	44
II.3.5	Poder anti-radical (PA)	45
II.3.5.1	Preparación del extracto	45
II.3.5.2	Determinación del PA	45
II.3.6	Análisis estadístico	46
II.4	Resultados y discusión	47
II.4.1	Contenido de fenoles totales	47
II.4.2	Contenido de flavonoides	48
II.4.3	Contenido de ácido ascórbico (AsA) y ácido dehidroascórbico (ADA)	49
II.4.4	Poder anti-radical (PA)	52
II.5	Conclusiones	55

CAPITULO III: EFECTO DE LA RADIACION UV-C SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

III.1.	Introducción	56
III.1.1	Superóxido dismutasa	56
III.1.2	Ascorbato peroxidasa	57

III.1.3	Catalasa (CAT)	58
III.1.4	Peroxidasa (POX)	60
III.1.5	Cooperación entre enzimas antioxidantes	61
III.1.6	Cooperación entre los diferentes sistemas antioxidantes	63
III.2.	Objetivo	64
III.3.	Materiales y Métodos	65
III.3.1	Material vegetal	65
III.3.2	Tratamiento con luz UV-C	65
III.3.3.	Medida de la actividad de enzimas antioxidantes	65
III.3.3.1	Superóxido dismutasa (SOD)	65
III.3.3.1.1	Extracción y medida de la actividad enzimática	65
III.3.3.1.2	Optimización de la condiciones de reacción	66
III.3.3.2	Ascorbato peroxidasa (APX)	66
III.3.3.2.1	Extracción y medida de la actividad enzimática	66
III.3.3.2.2.	Optimización de la condiciones de reacción	67
III.3.3.3	Catalasa (CAT)	67
III.3.3.3.1	Extracción y medida de la actividad enzimática	67
III.3.3.3.2	Optimización de la condiciones de reacción	68
III.3.3.4	Peroxidasa (POX)	69
III.3.3.4.1	Extracción y medida de la actividad enzimática	69
III.3.3.4.2	Optimización de la condiciones de reacción	69
III.3.3.4	Contenido de proteínas	69
III.3.3.5	Análisis estadístico	70
III.4.	Resultados y discusión	71
III.4.1	Superóxido dismutasa (SOD)	71
III.4.1.1	Optimización de la condiciones de reacción	71
III.4.1.2	Cambios en la actividad de SOD durante el almacenamiento	73
III.4.2	Ascorbato peroxidasa (APX)	74
III.4.2.1	Optimización de la condiciones de reacción	74
III.4.2.2.	Cambios en la actividad de APX durante el almacenamiento	77
III.4.3	Catalasa (CAT)	78
III.4.3.1	Optimización de la condiciones de reacción	78
III.4.3.2	Cambios en la actividad de CAT durante el almacenamiento	80
III.4.4	Peroxidasa (POX)	82
III.4.4.1	Optimización de la condiciones de reacción	82
III.4.4.2	Cambios en la actividad de POX durante el almacenamiento	83
III.5.	Conclusiones	86
BREVE DISCUSION Y CONCLUSIONES FINALES		87
REFERENCIAS		92



RESUMEN

RESUMEN

Los pimientos (*Capsicum annum* L.) son frutos susceptibles de sufrir daño por frío (DPF) al ser almacenados a temperaturas menores a las recomendadas. La radiación UV-C sería una tecnología poscosecha que podría reducir los síntomas de DPF. En este trabajo frutos de pimiento tipo Blocky (cv Comago) con más del 80% de color rojo, fueron expuestos a radiación UV-C y almacenados a 0°C con el fin de evaluar su incidencia sobre el DPF y la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática del fruto durante el desarrollo del DPF. Se determinaron las variaciones en el color; las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); el contenido de compuestos antioxidantes ácido ascórbico (AsA) y dehidroascórbico (ADA), flavonoides (FLAV) y fenoles totales (FT); el poder anti-radical (PA); y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX). Se ensayaron dos dosis de radiación UV-C, que redujeron los síntomas de DPF, y se eligió la de 10 kJ/m² dado el menor tiempo de exposición y gasto energético ocasionado. Los síntomas de DPF se manifestaron a los 7d en frutos no irradiados, mientras que en los tratados se observaron hacia los 14d y aún a los 28d presentaban una reducción apreciable del DPF. Los tratamientos UV-C efectuados no ocasionaron alteraciones indeseables en el desarrollo de color, pero redujeron la pérdida de peso durante el almacenamiento probablemente debido a la mayor integridad de los tejidos. Los resultados hallados en este trabajo indicaron que inmediatamente luego del tratamiento se observó un aumento en la actividad de enzimas asociadas a la detoxificación de H₂O₂ (APX, CAT y POX) pero no de O₂⁻ (SOD). También se observó un ligero incremento en la peroxidación lipídica (contenido de TBARS) que no se tradujo en sintomatología deletérea en los frutos. En tanto que, dentro de los componentes no enzimáticos se observó una reducción en los niveles de FT, probablemente debida al incremento registrado en la actividad de POX. Asimismo, no se observó variación en los niveles de AsA y siendo éste el mayor contribuyente del PA, explicaría por qué no se observó una variación en el PA inmediatamente al tratamiento UV-C. Durante el almacenamiento, los frutos tratados con UV-C mostraron valores superiores de AsA y PA, acumulación de FT y valores constantes de FLAV. Si bien los frutos tratados mantuvieron niveles superiores de actividad APX y CAT, respecto de los controles, éstas disminuyeron al día 14 coincidentemente con la aparición del DPF en dichos frutos. En resumen, el tratamiento con radiación UV-C activaría el sistema antioxidante del fruto confiriéndole resistencia al estrés posterior (baja temperatura de almacenamiento), lo que podría contribuir al retraso de la aparición de los síntomas de DPF en los frutos.



OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto de la radiación UV-C sobre la capacidad antioxidante y el desarrollo del daño por frío en pimientos.

Objetivos Parciales

- Evaluar el efecto del tratamiento con radiación UV-C sobre los síntomas de daño por frío en pimientos.
- Estudiar el efecto del tratamiento UV-C sobre el contenido de compuestos antioxidantes de pimientos.
- Analizar la evolución de enzimas antioxidantes durante el desarrollo del daño por frío. Efecto de la radiación UV-C.
- Establecer la relación entre el sistema de defensa antioxidante y la incidencia del daño por frío en pimientos.



INTRODUCCION GENERAL

1. GENERALIDADES DE PIMIENTO

El pimiento (*Capsicum annum L.*) pertenece a la familia de las solanáceas, que incluye también a la berenjena, tomate y papa. Se denomina p prika en Portugal y España, pepper en EEUU y en otros países es conocido como "morrón" o "aji dulce".

La **planta** es un pequeño arbusto anual, con hojas lanceoladas y flores escasas de color blanco o blanco amarillentas. Se adapta bien a los climas cálidos y no tolera las heladas.

El **fruto** es una baya hueca y de color variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco); algunas variedades van pasando del verde al anaranjado y al rojo a medida que van madurando. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde escasos gramos hasta más de 500 g. La pared del fruto puede ser gruesa, mediana o delgada. Se caracteriza por su pungencia o astringencia. Las **semillas** se encuentran insertas en una placenta c nica de disposición central. Son redondeadas, ligeramente reniformes, de color amarillo pálido y longitud variable entre 3 y 5 cm (FAO, 2006).

1.1 ANTECEDENTES

El pimiento, es un fruto no climatérico, originario de la parte norte de Latinoamérica. En México se domestic  su cultivo y es donde se encuentra su centro de diversidad. Se cultiva en muchos de los climas tropicales y templados de todo el mundo, especialmente desde el norte de Colombia hasta el sur de Estados Unidos. Es un cultivo importante en México y República Dominicana (Wikipedia, 2007). También se cultiva en Argentina.

Se cree que el nombre del pimiento le fue adjudicado por Cristóbal Colón, al descubrirlo, lo denominó así al confundirlo con "*pimienta en vainas, ...muy fuerte, pero no con el sabor de levante*"; pese a que botánicamente no tiene nada en común con ella, que es el fruto del *Piper nigrum*, el nombre perduró. A diferencia de otras plantas comestibles provenientes de América, que tardaron décadas en ser aceptadas por los europeos, el pimiento tuvo una rápida difusión mundial tras su llegada a España en 1493 (Wikipedia, 2007).

1.2 PROPIEDADES Y VALOR NUTRITIVO

Los pimientos, especialmente los rojos maduros, constituyen una fuente importante de vitamina C, superando a los cítricos (naranjas, limones y pomelos) y siendo una de las plantas que posee más cantidad después de la acerola (*Malpighia glabra L.*). También contiene gran cantidad de licopeno, pero en menor proporción que el tomate, y beta-caroteno en menor

proporción a la zanahoria. Este fruto se caracteriza por su pungencia o astringencia, debido a un alcaloide denominado capsaicina o capsicina, constituyendo así, una fuente importante de antioxidantes (componentes que previenen desórdenes cardiovasculares, cáncer y cataratas) (Martínez, 2007). En la Tabla 1 se muestra su composición nutricional.

Tabla 1. Composición nutricional del pimiento expresada por cada 100 g de parte comestible (USDA, 2007).

Componente	Pimiento verde	Pimiento rojo
Agua (g)	93,89	92,21
Energía (kcal)	20	26
Proteína (g)	0,86	0,99
Lípidos (g)	0,17	0,30
Cenizas (g)	0,43	0,47
Carbohidratos (g)	4,64	6,03
Fibra (g)	1,7	2,0
Azúcares totales (g)	2,4	4,2
Minerales		
Calcio (mg)	10	7
Hierro (mg)	0,34	0,43
Magnesio (mg)	10	12
Fósforo	20	26
Potasio (mg)	175	211
Sodio (mg)	3	2
Vitaminas		
Vitamina C (mg)	80,4	190
Tiamina (mg)	0,057	0,054
Riboflavina (mg)	0,028	0,085
Niacina (mg)	0,48	0,979
Vitamina A (UI)	370	3131
Vitamina E (mg)	0,37	1,58
Carotenoides		
β-caroteno (µg)	208	1624
β-criptoxantina (µg)	7	490
Licopeno (µg)	0	308

1.3 TIPOS DE PIMIENTO

Pueden considerarse tres grandes grupos de pimiento (Infoagro, [sin fecha]):

- **Dulces:** presentan frutos de gran tamaño y se utilizan para consumo en fresco e industria conservera.
- **De sabor picante:** muy cultivados en Sudamérica, suelen ser variedades de fruto largo y delgado.
- **Para la obtención de pimentón:** son un sub-grupo de las variedades dulces.

Dentro de los *frutos dulces* se pueden destacar tres tipos más importantes comercialmente (Infoagro, [sin fecha]):

- **California:** frutos cortos (7-10 cm), anchos (6-9 cm), con tres o cuatro cascos bien marcados, con el cáliz y la base del pedúnculo por debajo o a nivel de los hombros y de carne más o menos gruesa (3-7mm) (Figura 1A). Son los cultivares más exigentes en temperatura, por lo que la plantación se realiza temprano (desde mediados de mayo a comienzos de agosto, dependiendo de la climatología de la zona), para alargar el ciclo productivo y evitar problemas de cuajado con el descenso excesivo de las temperaturas nocturnas.
- **Lamuyo:** denominados así en honor a la variedad obtenida por el INRA francés, con frutos largos y cuadrados de carne gruesa (Figura 1B). Los cultivares pertenecientes a este tipo suelen ser más vigorosos (de mayor porte y entrenudos más largos) y menos sensibles al frío que los de tipo California, por lo que es frecuente cultivarlos en ciclos más tardíos.
- **Italiano:** frutos alargados, estrechos, acabados en punta, de carne fina (Figura 1C), más tolerantes al frío, que se cultivan normalmente en ciclo único, con plantación tardía en septiembre u octubre y recolección entre diciembre y mayo.

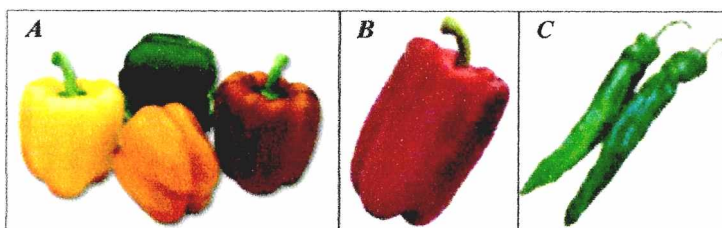


Figura 1. Tipos de pimiento: A.- California, B.- Lamuyo y C.- Italiano

1.4 PRODUCCION Y CONSUMO

El consumo del pimiento ha tenido un considerable aumento en los últimos años, en todo el mundo. Desde hace muchos siglos ha sido consumido principalmente en países en vías de desarrollo como los latinoamericanos, africanos y asiáticos, mientras que en países como los de la Unión Europea y Estados Unidos su consumo ha ido en aumento. Desde 1993, la producción

mundial de pimientos ha tenido un crecimiento del 48% de la superficie y duplicando los volúmenes de producción (Conaproch, [sin fecha]).

Según los datos más recientes de FAO (2006) la superficie mundial sembrada de pimientos asciende a 1.696.891 ha, con una producción de 25.015.498 ton. De 1993 a la fecha se observa un incremento del 40% en los rendimientos unitarios, debido al uso de nuevas tecnologías, quedando en un promedio de 14.74 ton/ha.

Estados Unidos y Alemania son los dos países con una mayor participación en las importaciones, representando entre ambos el 43% del volumen y el 46% del valor de las importaciones mundiales. Les siguen Reino Unido, Francia, Holanda y Canadá (Conaproch, [sin fecha]).

En América los principales países productores son México y EE.UU, con un 48 y 34% de la producción total del continente, respectivamente. En Sudamérica destacan por su producción total Argentina, Chile, y Venezuela (Educarchile, [sin fecha]).

En Argentina se cultivan anualmente alrededor de 13.000 has de pimiento, lo que implica una producción de 65.000 ton. Desglosando la producción de acuerdo al tipo de pimiento producido se tiene: 2.000 has de pimiento temprano, siendo importantes las producciones localizadas en Salta, Jujuy y Corrientes; 6.000 has de pimiento de época (que se cosecha de diciembre a junio), que incluye al pimiento híbrido de Lamuyo llamado también "4 cascós" y al pimiento para conserva tipo Lamuyo conocido también como "calahorra", destacándose las provincias de Tucumán, Mendoza y Buenos Aires en estos rubros; y por último el pimiento para pimentón, cuya producción está localizada en las provincias de Catamarca y Salta, con una superficie total de 2.500 has (INTA, 2000).

La zona hortícola platense es un área muy importante de producción de pimiento, tanto a campo como bajo cubierta. Las ventas se hacen desde mediados de diciembre a mayo (Tabla 2) y se realizan en el mercado a través de consignatarios (Teppa y col., 1994)

Tabla 2. Estacionalidad de la producción de pimiento en la zona hortícola platense.

Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic

	Media/Baja Producción
	Alta producción

En la Tabla 3 se describe la producción de pimiento de la zona hortícola platense y de mayor influencia en el Mercado Central de Buenos Aires. Fue presentado por el Censo Hortiflorícola de la Provincia de Buenos Aires del año 2005, elaborado por la Dirección Provincial de Estadísticas (DPE) y la Dirección de Economía Rural (DER). Se registra la mayor producción en la zona de La Plata.

Tabla 3. Producción de pimiento de la zona hortícola platense (Censo Pcia. Bs.As. 2005).

LOCALIDAD	PRODUCCION	
	Ha	Tn
Berazategui	4,4	142,6
E. Echeverría	1,2	13,8
F. Varela	16,75	786,0
La Plata	156,5	8.607,0
Moreno	1,25	16,15
Total Pcia de Bs As	322,0	14.900,0

1.5 COSECHA

Los precios y la demanda por un lado y las temperaturas por otro, son los factores que van a determinar el momento y la periodicidad de la cosecha, recolectando antes de su madurez fisiológica en verde o en rojo según interese (Infoagro, [sin fecha]).

El momento de la recolección se establece en función del tipo de pimiento y según los siguientes índices de cosecha:

- Pimientos Verdes: tamaño, firmeza y color del fruto.
- Pimientos de Color: un mínimo de 50% de coloración.

La cosecha se realiza a mano, en forma escalonada (cada siete o diez días por tres o cuatro semanas), recomendando realizarla en los períodos del día cuando la temperatura no sea muy elevada. El fruto debe ser cosechado cuidando que el pedúnculo y el cáliz queden adheridos al mismo, ya que esto los hace menos susceptibles al ataque de podredumbres. Esta tarea se debe realizar preferentemente cortándolos con tijeras bien afiladas, para hacer un corte nítido. Los frutos se colocan en recipientes que no los dañen, evitando exponerlos al sol en forma directa y deben ser llevados a un lugar apropiado para adecuarlos (Infoagro, [sin fecha]).

1.6 ALMACENAMIENTO POSCOSECHA

Los factores ambientales que incluyen: temperatura, humedad relativa, atmósfera de almacenamiento, etileno y susceptibilidad a enfermedades, influyen en el deterioro de productos hortifrutícolas:

a) Temperatura óptima: Los pimientos se deben enfriar lo más rápido posible para reducir pérdidas de agua. Los pimientos almacenados a temperaturas mayores a 7.5°C se deshidratan notablemente. Para una vida útil más larga (3-5 semanas) lo mejor es almacenar los frutos a 7.5°C. También se pueden almacenar por dos semanas a 5°C, lo que reduce pérdidas de agua pero conlleva a la manifestación de daño por frío tras ese periodo. La tasa de respiración a 10 y 5°C, es de 5-8 y 3-4 mL CO₂/kg h, respectivamente. La tasa de respiración de los frutos rojos y verdes es similar. Los pimientos son frutos no-climactericos y producen niveles muy bajos de etileno: 0.1-0.2 µL/kg-h a 10° o 20°C, respectivamente (Cantwell, 2002).

b) Humedad relativa óptima: Debe ser mayor al 95%; la firmeza de los pimientos se relaciona directamente con la pérdida de agua (Cantwell, 2002).

c) Efectos del Etileno: El etileno tiene poco efecto en el pimiento. Para acelerar la maduración o el cambio de color, lo más efectivo es mantener los pimientos con una coloración parcial a temperaturas tibias de 20-25°C con una humedad alta (>95%) (Cantwell, 2002).

d) Efectos de las Atmósferas Controladas (AC): Por lo general, no hay efecto de la AC en el pimiento. Las atmósferas que sólo tienen una concentración baja de O₂ (2-5%) tienen poco efecto en la calidad del fruto, y las atmósferas con una alta concentración de CO₂ (>5%) pueden dañar a los pimientos (picado, coloración anormal, ablandamiento), especialmente si se almacenan a menos de 10°C. Atmósferas con un 3% O₂ + 5% CO₂ fueron más benéficas para los pimientos rojos que para los verdes, cuando éstos se almacenaron a 5-10°C por 3-4 semanas (Cantwell, 2002).

e) Enfermedades: Las enfermedades son una causa importante de pérdida poscosecha, particularmente en combinación con el daño por frío. Los organismos de pudrición más comunes son *Botrytis*, *Alternaria*, y las pudriciones blandas producidas por bacterias u hongos (Cantwell, 2002).

f) Fisiopatías: Las principales fisiopatías causantes de pérdidas poscosecha, reduciendo la calidad del fruto, incluyen: pudrición apical, moteado y daño por frío (Cantwell, 2002).

1.7 EL PIMIENTO Y EL DAÑO POR FRÍO (DPF)

El pimiento, es una de las numerosas especies susceptibles al daño por las bajas temperaturas. Este fruto resiste hasta temperaturas de 7°C, a temperaturas menores, sufre DPF (González-Aguilar y col., 2000). Esta fisiopatía provoca manchas en la superficie, así como la susceptibilidad a los ataques de *Alternaria* y cuando la temperatura es inferior de 4°C favorece la aparición de *Botrytis*, perdiendo los frutos el buen aspecto externo, sabor y aroma.

Por otro lado, el estado de madurez de cosecha verde-maduro es más sensible a las bajas temperaturas que los frutos cosechados al estado rojo-maduro. Es así que, en pimientos tipo Lamuyo verde-maduro se observó DPF al ser almacenados a 2°C, mientras que en los rojo-maduro se desarrolló en menor magnitud (Serrano y col., 1997). La diferencia en la tolerancia a las bajas temperaturas también depende de la variedad considerada.

1.8 TECNOLOGÍAS POSCOSECHA PARA REDUCIR EL DAÑO POR FRÍO

Existen numerosas técnicas poscosecha que potencialmente pueden reducir o evitar la incidencia del DPF.

Se pueden dividir en dos grupos, el primero que involucra manipular y modificar el entorno de almacenamiento, incluye el uso de las siguientes tecnologías:

- **Tratamiento térmico**, con el uso de un período de pre-almacenamiento utilizando temperaturas bajas o altas. En el primer caso, el producto es expuesto a temperaturas ligeramente mayores al rango crítico de DPF, lo cual aumenta la tolerancia a la posterior exposición a temperaturas más bajas. En el segundo caso, con altas temperaturas previas aplicadas por un corto tiempo, se reduce la pérdida de peso, se provee protección contra el desarrollo de microorganismos y también se reduce el DPF.
- **Calentamiento intermitente**, es la interrupción del almacenamiento a baja temperatura con uno o más períodos de temperaturas cálidas. Se debe aplicar antes de que el DPF sea irreversible.
- **Atmósfera controlada**, consiste en modificar intencionalmente la atmósfera que rodea a los productos almacenados disminuyendo el nivel de O₂ e incrementando el nivel de CO₂.

El segundo grupo de técnicas involucran un tratamiento directo sobre el producto, dentro de este grupo se incluyen tecnologías como:

- **Tratamientos químicos**, como el uso de Ca^{+2} que confiere rigidez a las paredes y membranas celulares y ayuda a soportar el DPF. También se recurre al uso de aceites vegetales que tiene propiedades antitranspirante y antioxidante.
- **Reguladores de crecimiento**, con el uso de compuestos que afectan procesos bioquímicos y fisiológicos de los tejidos vegetales. Entre ellos se encuentran el ácido jasmónico o su derivado metil jasmonato, ácido absicico, etileno y poliaminas.
- **Encerado y otras coberturas**, para restringir el intercambio de gases y transpiración del producto fresco, tiene un efecto similar al empaçado en películas.
- **Radiación UV-C**, utilizada principalmente para controlar enfermedades poscosecha y retrasar algunos procesos relacionados con la maduración y senescencia de frutos y hortalizas. En la siguiente sección se explicarán detalladamente los principios y aplicaciones de esta tecnología.

Estas técnicas actúan sobre el DPF tanto al incrementar la tolerancia del producto a la temperatura de daño o al retardar el desarrollo de los síntomas. Algunas de estas técnicas son más efectivas que otras en ciertos productos, y las condiciones óptimas varían en los diferentes productos y variedades.

2. RADIACION ULTRAVIOLETA

La radiación ultravioleta (UV) fue descubierta por Ritter en 1801. Perteneció a la franja del espectro electromagnético con longitudes de onda entre 400 y 10 nm aproximadamente (Portero, [sin fecha]). Se extiende desde la parte violeta del espectro visible hasta la zona de rayos X blandos, aunque ambos límites son arbitrarios (figura 2).

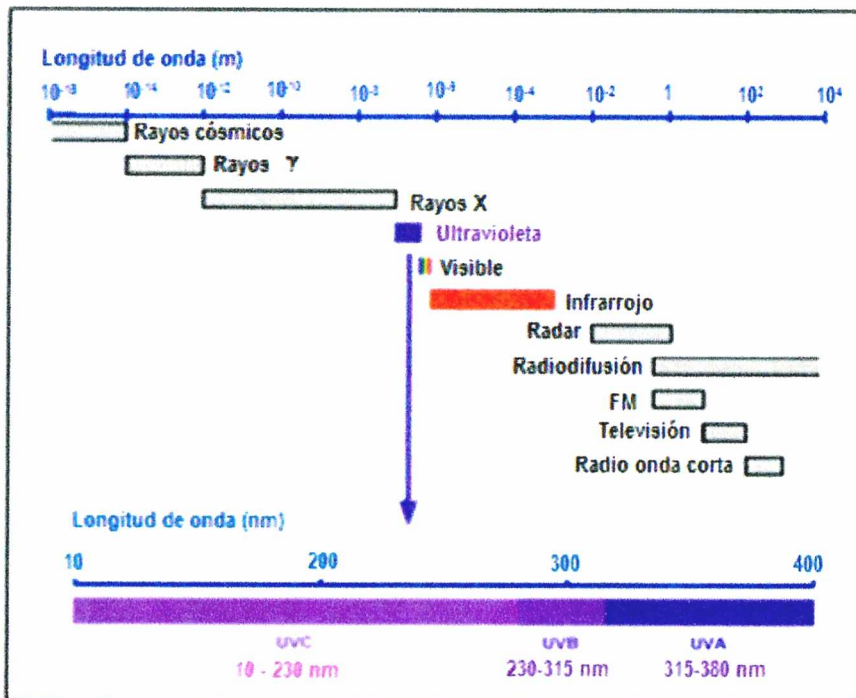


Figura 2. Espectro de radiación magnética y ultravioleta (Algaba, 2005)

La intensidad de la radiación UV se expresa como irradiancia o flujo de intensidad (W/m^2) y la dosis, que es una función de la intensidad y el tiempo de exposición (Alzamora, 2007), se expresa como exposición radiante (kJ/m^2). La región del espectro electromagnético que corresponde a la luz UV puede ser dividida en tres partes (Tabla 4):

Tabla 4. Tipos de radiación UV y su longitud de onda (Wikipedia, 2008)

Tipo radiación UV	Longitud de onda (nm)	Energía-fotón
UV-A	380-315	3,9-3,1 eV
UV-B	315-290	4,3-3,9 eV
UV-C	290-100	6,2-4,3 eV
UV-de vacío	100-10	6,2-124 eV

La radiación **ultravioleta A (UV-A)** abarca longitudes de onda entre 380 y 315 nm; es la parte menos energética de la radiación UV (3,1-3,9 eV). Tiene importancia por su capacidad para producir bronceado con un mínimo eritema cutáneo. Se emplea comercialmente para el bronceado de la piel y el tratamiento de la psoriasis (Algaba, 2005).

La radiación **ultravioleta B (UV-B)** se extiende entre los 315 y 290 nm. No es útil para el bronceado, ya que, a igual dosis que los UV-A, es 200-2.000 veces más probable que produzca eritema y quemaduras. Se usa en el tratamiento de Goeckerman para la psoriasis y parece ser efectiva en el tratamiento del prurito urémico (Algaba, 2005).

La radiación **ultravioleta C (UV-C)** se extiende entre los 290 y 100 nm; es la porción más energética del espectro, de forma que posee una importante acción bactericida.

La luz UV-C sólo puede ionizar determinadas moléculas y en determinadas condiciones por lo tanto se la considera radiación no ionizante. Los fotones UV-C tienen energía suficiente para destruir uniones químicas causando reacciones fotoquímicas que serían las responsables de los efectos biológicos que producen las radiaciones UV (Algaba, 2005).

2.1 EFECTOS DE LA LUZ UV SOBRE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

La radiación UV tiene un efecto letal y mutagénico sobre los **microorganismos**, que se debe a la absorción selectiva de longitudes de onda por parte de ciertas moléculas biológicas: las proteínas y el ADN.

Los rayos UV provocan cambios químicos en las moléculas absorbentes, de modo que aparecen moléculas alteradas denominadas genéricamente fotoproductos. Los fotoproductos generados por la luz UV en el ADN derivan principalmente de alteraciones en las bases pirimidínicas (citosina, timina) y originan la inactivación de macromoléculas.

Las consecuencias de inactivar proteínas o ARN no son letales, ya que existen muchas copias de cada uno de estos tipos de macromoléculas, y se pueden volver a sintetizar. En cambio, la inactivación del único cromosoma de la bacteria tiene efectos letales primarios y efectos mutagénicos secundarios. Por lo tanto, el espectro de acción biológica de la luz UV equivale al de absorción del UV por el ADN (260 nm) (Rupp, 1996).

La radiación efectiva absorbida por el producto depende de algunos factores que incluyen: la rigidez de la pared celular, distribución de organelas, pigmentos intracelulares y la estructura y configuración de las moléculas en el momento de la irradiación.

En las células **vegetales**, el ADN, particularmente, es una de las moléculas blanco de las radiaciones UV-C. La dimerización de timinas (Bolson, 1999) es una de las reacciones fotoquímicas cuando este tipo de radiación es absorbida por el ADN, consecuentemente llevaría a una menor actividad biológica del ADN. Las proteínas que poseen grupos aromáticos que absorben a estas longitudes de onda también son dañadas por radiación UV. La luz UV-C produce también reacciones de fotooxidación en plantas a través de la producción de radicales libres y generación de especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres y superóxidos cuando están en alta concentración en los tejidos pueden dañar membranas celulares, ácidos nucleicos, pared celular y proteínas.

Los fotones de luz UV-C son absorbidos por las clorofilas, pigmentos fotosintéticos. La energía absorbida es utilizada por los electrones de las moléculas para pasar a un nivel de mayor energía (electrones excitados) generando radicales libres. Un exceso de radiación UV-C daña la estructura de los cloroplastos ya que desorganiza los tilacoides, y produce una progresiva desorganización de los complejos pigmento proteínas y de la doble membrana de cloroplastos. Se ha demostrado que este daño es producido por una excesiva acumulación de radicales libres, principalmente hidroxilos y metilos, como consecuencia de la situación de estrés (Hideg y Vass, 1996).

Cuando las plantas son sometidas a una situación de estrés con luz UV, se produce una reorganización de la estructura de las células vegetales, aparece una acumulación de carotenoides secundarios: se forman cuerpos lipídicos que contienen carotenoides, primero dentro de los cloroplastos que luego se convierten en cromoplastos y se ubican en la periferia de las células y finalmente forman una capa lipídica rica en carotenoides secundarios dentro de la pared celular. La capa lipídica cumple funciones de filtro de luz, protege a los componentes celulares del daño fotooxidativo y de las pérdidas de agua (Barth y Zhuang, 1996).

El exceso de radiación induce la producción de radicales libres, los cuales generan una respuesta en el tejido de la planta (estimular un sistema antioxidante, por ejemplo) de modo de adaptarse a la nueva situación de estrés. No obstante, si la producción de radicales libres supera a los mecanismos de defensa entonces se producirá daño que puede llegar a ser irreversible. Si bien las radiaciones UV-C en exceso pueden resultar perjudiciales para los tejidos, si se utilizan bajas dosis o más precisamente dosis adecuadas se pueden lograr determinados efectos benéficos en los tejidos (Cisneros-Zevallos, 2003).

2.2 APLICACIONES DE LA LUZ UV

La tecnología UV actualmente se usa en un conjunto extenso de aplicaciones desde la protección básica de agua potable hasta un tratamiento final para enjuagues de limpieza de partes electrónicas libre de gérmenes. Actualmente la luz UV es una alternativa establecida y de creciente popularidad al uso de químicos para la desinfección de agua, agua residual, aguas industriales de varias calidades y superficies de envases y alimentos.

En el año 1980, Luckey (1980) introdujo el concepto de "hormesis", definido como la estimulación de un efecto beneficioso en los tejidos en respuesta a dosis bajas o subletales de un agente causante de estrés físico o químico. Es por ello que en los últimos años se comenzó a utilizar las radiaciones con luz UV-C como posible estrategia en la tecnología de poscosecha.

En el sector frutihortícola son necesarias prácticas de conservación de productos frescos y frescos mínimamente procesados que mantengan sus atributos de calidad durante la manipulación, distribución y venta. Además, como el uso de muchos tratamientos poscosecha con sustancias químicas causan problemas ecológicos o son potencialmente perjudiciales para el ser humano, en muchos países se ha restringido su uso. Por esta razón es necesario desarrollar métodos de control alternativos y seguros (Artés, 1995). Como métodos alternativos a los utilizados actualmente en la industria frutícola se usan procesos "no térmicos" para conservar alimentos sin los efectos colaterales de los tratamientos térmicos y entre ellos figura la aplicación de luz ultravioleta (UV).

Tratamientos basados en la irradiación UV-C, han sido probados como una alternativa tecnológica capaz de reducir la tasa de maduración y activar una respuesta de defensa natural en la planta para incrementar la vida poscosecha de frutos y hortalizas. Con este objetivo, se han realizado numerosos estudios, por ejemplo, Liu y col. (1991) reportaron que la exposición a dosis bajas de UV-C retrasó la maduración y senescencia en manzana, encontrándose resultados similares en otros productos como mango (González-Aguilar y col., 2001), durazno (González-Aguilar y col., 2004) y naranja (D'hallewin y col., 1999).

También es conocida la efectividad de la radiación UV-C para el control de enfermedades en poscosecha. Conserva la calidad en productos como lechuga (Allende y Artés, 2003). Controla el desarrollo de hongos asociados con procesos de maduración en papaya (Cia y col., 2007), uva (D'hallewin y col., 2000) y zapallo (Erkan y col., 2001). Retrasa la senescencia en brócoli (Costa y col., 2006). Controla el daño por frío y el desarrollo de hongos en pimiento (Vicente y col., 2005), sin embargo pocos estudios se han realizado para elucidar el modo de acción de la radiación UV-C sobre estos sistemas. Barka y col., (2000) estudiaron los efectos

de la luz UV-C en la inducción de algunas enzimas en tomate y encontraron una significativa peroxidación lipídica, pérdida de electrolitos a través de membrana y la inducción de enzimas relacionadas al estrés oxidativo como guayacol peroxidasa y ascorbato peroxidasa, además reportaron la activación de enzimas involucradas en mecanismos de defensa como la fenilalanina amonioliasa y lipooxigenasa (Barka, 2001).

La radiación UV se perfila como una de las tecnologías con mayor aplicación en el futuro. Una propuesta de Cisneros-Zevallos (2003), sugiere la aplicación poscosecha de un tipo de estrés abiótico controlado (exposición a luz UV-C) para inducir la producción e incremento de la síntesis de compuestos fotoquímicos con actividad nutracéutica, o la reducción de compuestos indeseables. Así el control del estrés inducido por la luz UV-C puede usarse como una herramienta para reforzar las propiedades benéficas de productos frescos enteros o cortados.

Con estos antecedentes, se hace necesaria más evidencia experimental para elucidar el modo de acción de esta tecnología aplicada a productos hortifrutícolas.



CAPITULO I

EFECTO DEL TRATAMIENTO UV-C SOBRE EL DESARROLLO DEL DAÑO POR FRIO

I. 1. INTRODUCCION

I.1.1. DAÑO POR FRIO EN FRUTOS Y HORTALIZAS

La refrigeración es la herramienta más ampliamente usada para extender la vida poscosecha de las frutas y hortalizas. Un inadecuado manejo de las bajas temperaturas, sin embargo, conduce a un acelerado deterioro de la calidad.

El **daño por frío (DPF)** es un desorden fisiológico que se presenta en muchos productos horti-frutícolas cuando son expuestos o almacenados por debajo de las temperaturas recomendadas para cada especie en particular por periodos prolongados.

El DPF es el resultado de un desequilibrio acumulativo en el metabolismo celular pero que es reversible en una primera fase. Una breve elevación de la temperatura restituye la condición inicial si no se han llegado a provocar daños permanentes. Distintas investigaciones han demostrado que breves interrupciones de la conservación frigorífica mediante la elevación de la temperatura (de 12 a 25 °C) por periodos cortos (5 a 48 horas) en forma periódica (6-7 hasta 15 días) son beneficiosas y contribuyen a extender la vida poscosecha (Fernández Trujillo, 2000). Como se mencionó anteriormente, el DPF es acumulativo, dado que en muchos casos se da la situación de que las temperaturas bajas en cultivo, se suman a las recibidas durante el almacenamiento y/o transporte.

La mayor parte de las especies sensibles al DPF son de origen tropical o subtropical como tomate, pimiento, berenjena, zapallo, zapallito, batata, banana, entre otras. También puede afectar a algunas especies de clima templado como espárrago, papa, algunas variedades de manzana, duraznos, entre otras (López Camelo, 2003).

Los **síntomas** con los que se manifiestan los desórdenes fisiológicos provocados por el frío en frutas y hortalizas son muy diversos, distinguiéndose dos categorías, que pueden coexistir y desarrollarse simultáneamente. La primera categoría muestra una naturaleza cualitativa y consistente en anomalías del desarrollo o del metabolismo, como la maduración incompleta (tomate, papaya, mango, melocotón), menor desarrollo del sabor y aroma (banana, piña, sandía) (Hardenburg y col., 1990). La segunda categoría de DPF presenta variadas manifestaciones como depresiones de la piel o picado, que afecta al 60% de las especies de frutas y hortalizas de regiones tropicales y subtropicales, alteración de tejidos (en frutos de hueso y de pepita), pardeamientos internos o superficiales (cítricos, palta, piña, pimiento), infiltración de agua en los espacios intercelulares (tomate, pepino, papaya), debilitamiento de la

resistencia a daños mecánicos y al ataque microbiano (muy generalizado), (Hardenburg y col., 1990). Los síntomas, en general se observan con mayor intensidad cuando el producto es retornado a temperatura ambiente y dependen de la especie considerada, de la temperatura a que fuera expuesto y la duración de la misma.

1.1.2. FISILOGIA DEL DAÑO POR FRÍO EN PRODUCTOS HORTI-FRUTICOLAS

Son muy numerosas las disfunciones celulares y las alteraciones fisiológicas y bioquímicas que están íntimamente relacionadas con el estrés sufrido por el tejido vegetal que inducen las bajas temperaturas; involucran procesos como la estimulación de la tasa respiratoria y la emisión de etileno, reducción de la fotosíntesis, interferencia en la producción de energía, aumento de la energía de activación para reacciones metabólicas, cambios en la fluidez del protoplasma, aumento de la permeabilidad de la membrana, inactivación de algunas enzimas, desarreglo de la membrana y alteración de la estructura celular (Wang, 2000). En general, la alteración de los lípidos y la fluidez de la membrana serían los causantes de los síntomas posteriores del DPF. Esta teoría es la más aceptada actualmente.

1.1.3. TEORIA DE LA ALTERACION DE PROTEÍNAS

A temperaturas cercanas a 0°C, algunas enzimas tanto en animales como en vegetales, pueden sufrir la pérdida de su estructura cuaternaria con la consecuente pérdida de actividad enzimática y cambio en algunas de sus propiedades cinéticas, provocando un desbalance metabólico que puede conducir a la muerte celular.

Las bajas temperaturas pueden perturbar las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido, disminuyendo la fuerza relativa de los enlaces hidrofóbicos. Este debilitamiento podría ser la causa de las disfunciones de las enzimas solubles y su consecuente disociación en subunidades y/o desdoblamiento de polipéptidos. También podría ser una razón de la disfunción proteica producida en las enzimas de membrana que participan en interacciones termosensibles con los lípidos. Puesto que, para que una enzima mantenga una actividad normal se requiere de una conformación proteica óptima, la solidificación de los lípidos de membrana inhibiría dicha actividad enzimática a raíz de los cambios conformacionales en la estructura (figura 1.1)

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

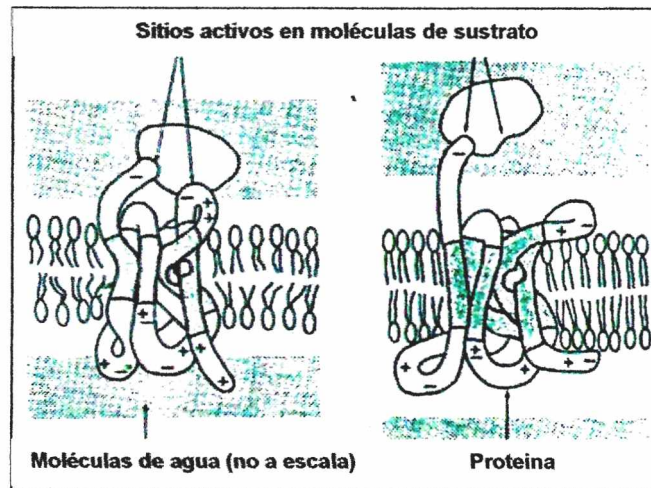


Figura 1.1. Versión altamente idealizada de una proteína intrínseca en una bicapa lipídica: **a)** los lípidos en estado fluido y su capacidad de deformación permiten a las regiones hidrofóbicas de las proteínas adoptar libremente la conformación requerida para su óptima combinación con el sustrato; **b)** lípidos en la fase gel; la región hidrofóbica más rígida y gruesa deforma las áreas hidrofóbicas de la proteína. La fase acuosa ordenada se distancia y el campo eléctrico es más fuerte por lo que la proteína se deforma y adopta el estado energético más bajo posible. En este estado deformado no puede formar un complejo activado con la molécula de sustrato (Parkin y col., 1989).

1.1.4. TEORIA DE LA TRANSICION DE FASE

Un modelo elegante para explicar muchos síntomas del DPF fue propuesto por Lyons y Raison (1970) y detallado por Lyons (1973). En este modelo, las bajas temperaturas son percibidas por la porción hidrofóbica de la bicapa lipídica en las membranas celulares y resulta una separación de dicha porción lipídica formando distintos dominios: una fase gel y una fase líquido-cristalina.

La fase gel, representa lípidos con baja cinética de movimiento y firmeza, empaquetamiento rígido de cadenas acídicas. La presencia de la fase gel en la bicapa lipídica de la membrana, afecta el funcionamiento apropiado de las proteínas integrales de membrana, y no mantendrá su efecto barrera, es decir se alteraría la permeabilidad de la membrana (figura 1.2).

En resumen, la teoría de transición de fase (Parkin y col., 1989) postula que la bicapa lipídica de la membrana puede sufrir una continua transición de fase (de líquido a gel) a una temperatura crítica.

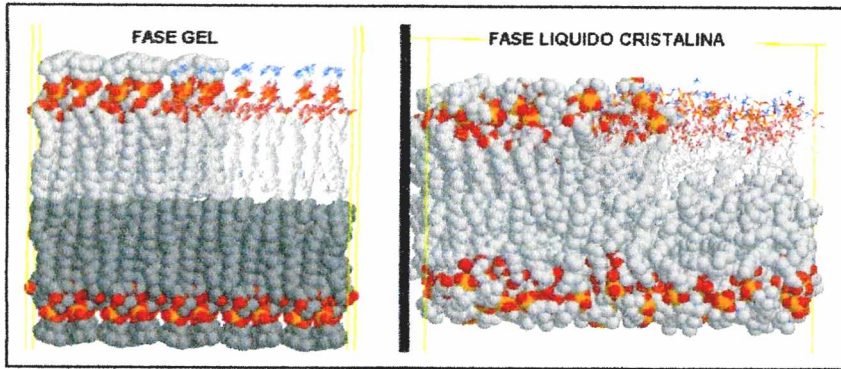


Figura 1.2. Esquema gráfico de las proteínas de membrana (fase gel y fase líquido cristalina) (Jakubowski, 2006)

A través de estos efectos primarios sobre las propiedades de fase de los lípidos de membrana, las bajas temperaturas provocan el desarrollo de una secuencia de eventos "secundarios" incluyendo la pérdida de turgencia, la fuga de solutos citoplasmáticos, la disminución de energía disponible para la actividad metabólica, la disrupción de los fotosistemas, la autólisis y finalmente la muerte celular.

Los experimentos originales de Lyons y Raison se enfocaron en la energía del metabolismo en la mitocondria. Así su hipótesis sostenía que la pérdida de integridad de la membrana por la separación de la porción hidrofóbica de los lípidos que la constituyen, formando los dominios gel y líquido-cristalino en la membrana mitocondrial interna desacoplaba el transporte de electrones para la síntesis de ATP.

Un postulado del modelo de Lyons y Raison, ha sido que cualquier factor que modifica la temperatura de transición de la fase lipídica, cambiaría la sensibilidad al frío. Consecuentemente, la fluidez y propiedades de fase de los lípidos de membrana son influenciados por el grado de saturación de los ácidos grasos. En las décadas de 1970 y 1980 se volcaron esfuerzos para establecer una correlación entre la saturación de los ácidos grasos y la sensibilidad al frío. Una primera aproximación de la teoría pareció válida (Kendrick y Bishop, 1986). Las plantas tropicales y subtropicales tienden a tener mayor cantidad de ácidos grasos saturados en sus membranas que los frutos de regiones templadas. Las plantas que se han adaptado a bajas temperaturas incrementan la proporción de ácidos grasos insaturados, disminuyendo su sensibilidad a las bajas temperaturas.

El desarrollo del DPF tiene lugar en dos fases sucesivas. La primera se prolonga desde algunas horas (banana o chirimoya) hasta meses (manzana, pera) aunque lo más frecuente es una duración de unas dos semanas (pepino, tomate, o cítricos). En esta fase inicial las alteraciones son tan poco severas que no se manifiestan los síntomas visibles, lo que se

denomina *umbral de inducción o fase de latencia*, y los productos pueden retornar a un estado normal, por simple calentamiento superior a la temperatura crítica. Esta etapa incluiría sucesos tales como: transición de fase de los lípidos de membrana, alteración de la cinética y especificidad de los sustratos de enzimas reguladoras, cambios en la estructura del citoesqueleto y otros (Wang, 1994). La segunda fase tiene lugar cuando, superado el umbral de inducción, aparecen los síntomas, su establecimiento es ya irreversible, y la aplicación de una elevación moderada de la temperatura solo contribuye a acelerar su desarrollo (Artés, 1995).

1.1.5. TEORIA DEL ESTRES OXIDATIVO

El DPF es mediado, en parte, por las especies reactivas de oxígeno (EROs) que causan daños secundarios a las membranas y fotosistemas. La activación del oxígeno por los fotosistemas en presencia de luz excesiva es probablemente, el mayor sitio de producción de radicales libres en hojas, mientras que en tejidos no fotosintéticos es el sistema transportador de electrones, especialmente en las mitocondrias, el que contribuye a la producción de EROs. Existe evidencia experimental que indica que la mitocondria es la mayor fuente de EROs en tejidos de plantas sensibles a bajas temperaturas (Purvis y col., 1995), pero también se conoce que existe un sistema antioxidante químico y enzimático capaz de neutralizar las EROs formadas. Si se produce una acumulación de EROs, esto provoca estrés oxidativo y el consecuente daño a nivel de proteínas, lípidos y DNA (Blokhina y col., 2002). Según Raison y Lyons (1986), el estrés oxidativo debe ser considerado como una respuesta secundaria a una lesión primaria en un sistema enzimático de óxido-reducción. El estrés oxidativo se asocia también con la respuesta a condiciones adversas (Hideg, 2004) como el estrés por radiación UV, exposición a bajas temperaturas, invasión de patógenos, acción herbicida y disminución de oxígeno, entre otros (Blokhina y col., 2002).

El desarrollo de los síntomas de DPF es con frecuencia coincidente con la peroxidación de ácidos grasos. La alteración de las propiedades físicas de los lípidos de membrana, contribuye al desarrollo de los síntomas visuales de DPF. Esta teoría tiene mérito considerable porque es la base para la cinética del proceso de DPF, asumiendo que las reacciones de iniciación son reversibles y con bajos límites de detección, a baja temperatura; y que, las reacciones de propagación no son evidentes hasta un ligero aumento de temperatura.

Solo si las reacciones de propagación, es decir la producción excesiva de EROs generados frente al estrés por las bajas temperaturas, exceden la capacidad de eliminación de

radicales libres, por un sistema celular de detoxificación tanto enzimático como no enzimático, el DPF es evidenciado por los síntomas visibles en el fruto y sería irreversible.

I. 2. DAÑO POR FRÍO EN PIMIENTO

Los frutos de pimiento son susceptibles al DPF en almacenaje a temperaturas menores de 7°C (González-Aguilar y col., 2000), y los síntomas visibles aparecen rápidamente después de trasladar la fruta a temperaturas mayores (Lin y col., 1993). Por otro lado, el estado de madurez pareciera tener una estrecha relación sobre la sensibilidad al daño por frío. Así, pimientos verdes son más sensibles a este desorden que frutos cosechados al estado rojo-maduro (Serrano y col., 1997; Paull, 1990). Se recomienda almacenar a temperaturas de 7-13°C por un máximo de 2-3 semanas, si los frutos son enfriados rápidamente después de la cosecha (CMCBA, 2004).

La sintomatología de DPF en pimiento se caracteriza por maduración anormal y no uniforme, pérdida de agua, depresiones superficiales laminares y circulares (también llamadas escaldaduras), pardeamiento de semilla, desarrollo de patógenos como *Alternaria alternata*, que causa la pudrición de mayor importancia en almacenamiento prolongado y *Botrytis cinerea* (Meier y col., 1995), aumento de producción de CO₂ y etileno al trasladarla a temperatura ambiente, mayor susceptibilidad a enfermedades, y mayor permeabilidad de membranas celulares provocando salida de iones, siendo el daño progresivamente más severo durante el almacenamiento por largos periodos a bajas temperaturas (Lin y col., 1993).

I. 3. CONTROL DEL DAÑO POR FRÍO EN PIMIENTO

Existen variados métodos para reducir el DPF en frutos de pimiento en poscosecha, tales como inmersión en agua caliente, uso de coberturas plásticas (atmósfera modificada), tratamientos químicos y radiación UV-C (Kehr, 2002).

La inmersión en agua caliente, que se ha usado tradicionalmente para controlar patógenos como hongos, se aplica por pocos minutos a temperaturas sobre 40°C, la cual es mayor a la que se utiliza con aire caliente o vapor caliente, calentándose sólo la superficie del producto. Su efecto es la inducción de termotolerancia transitoria en muchas plantas, a través de la síntesis de un grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (heat shock proteins: HSP), confiriendo al producto mayor tolerancia al DPF (Wang, 1994). La inmersión en agua a 53°C por 3 min reduce considerablemente el DPF, y junto con películas plásticas puede ser usada efectivamente para reducir el DPF y las pudriciones (González-Aguilar y col., 2001).

Por otro lado, el uso de embalaje sellado con películas plásticas combinado con almacenaje en frío es más beneficioso que el almacenaje refrigerado solamente, al retrasar el deterioro fisiológico de los frutos. La reducción de síntomas de DPF en pimientos recubiertos con película plástica se debe al aumento de humedad, reducción de O₂ y acumulación de CO₂ dentro de la envoltura, manteniendo una mejor apariencia. En estas condiciones se produce una micro atmósfera saturada de agua, aliviando el estrés hídrico, condición importante en el control de procesos vitales (Meir y col., 1995).

En cuanto a productos químicos, el ácido jasmónico existe naturalmente en las plantas y está involucrado en varios aspectos del desarrollo y en respuestas a estrés biótico y abiótico. En varios artículos se indica que tratamientos con metil-jasmonato reducen significativamente el DPF en pomelo, palta, pepino, zapallito italiano y pimiento (Fung y col., 2004). Meir y col. (1995) señalaron que en pimientos almacenados por 4-10 semanas a 2°C, el tratamiento de inmersión por 30 segundos en metil jasmonato 25 µM, redujo la severidad del DPF y el porcentaje de frutos dañados.

La evaluación de los tratamientos UV-C para disminuir enfermedades en frutas y hortalizas se ha ensayado en productos con su microflora normal o bien inoculados con microorganismos aislados, encontrándose resultados efectivos con distintas dosis. Como ejemplo se puede citar en pimiento el uso de dosis de 0,22-0,88 y 7 kJ/m² sobre *Botrytis cinerea* (Mercier y col., 2001) y *Alternaria sp.* (Vicente y col, 2005) respectivamente. También se ha ensayado la exposición a la luz UV-C antes de la inoculación con *Botrytis cinerea* en pimientos y se halló que la radiación UV-C induciría resistencia a la colonización de este tipo de moho (Mercier y col., 2001). Asimismo, se ha realizado una combinación de tratamiento térmico y radiación UV-C para alargar la vida útil de frutillas (Pan y col., 2004), también se ha reportado el beneficio de la combinación del tratamiento UV-C y posterior empacado en film poliolefinico en tunas (Piga y col., 1998). Sin embargo, muy pocos trabajos se han realizado con el fin de analizar el efecto de la radiación UV-C, sobre el desarrollo del DPF.

I. 2. OBJETIVO

Evaluar el efecto del tratamiento con radiación UV-C (10 kJ/m²) sobre la evolución del daño por frío en pimiento Blocky (*C. annum*, cv Cornago) almacenados a 0°C.

I. 3. MATERIALES Y METODOS

I.3.1. MATERIAL VEGETAL

Las experiencias se llevaron a cabo empleando pimientos tipo blocky (*Capsicum annum* L., cv Comago), cultivados en un invernadero de la zona de La Plata, Provincia de Buenos Aires. Los frutos se cosecharon con 80-90% de color superficial rojo y se trasladaron inmediatamente al laboratorio, donde se seleccionaron por tamaño uniforme, apariencia, grado de madurez, y ausencia de defectos. Los frutos seleccionados se lavaron con hipoclorito de sodio (100 mg/L) y se dejaron secar.

I.3.2. TRATAMIENTO CON LUZ UV-C Y SELECCIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA

Para determinar las condiciones experimentales adecuadas, se ensayaron diferentes dosis de luz UV-C. Los frutos se dividieron en dos grupos: control (no irradiados) y tratados (irradiados). Estos últimos se colocaron bajo cuatro lámparas UV-C (TUV G30T8, 30W, Philips) a una distancia de 30 cm y fueron irradiados con dosis de 10 y 20 kJ/m². La intensidad de la radiación fue medida con un radiómetro digital UV (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois.). Cada fruto fue rotado manualmente tres veces para asegurar una exposición uniforme a la luz UV en toda su superficie. Finalizado el tratamiento los frutos se colocaron en bandejas plásticas cubiertos con un film de PVC perforado y se almacenaron a 0°C durante 21 días. Los controles (sin ningún tratamiento) se empacaron con la misma película y almacenaron directamente a 0°C. Tanto para frutos control como tratados, se dispusieron 2 bandejas con 3 frutos cada una para cada tiempo analizado. Se retiraron de la cámara de almacenamiento a los 0, 7, 14 y 21 días para evaluar el efecto de cada tratamiento según el avance del daño por frío mediante el valor de índice de daño, color superficial y pérdida de peso. La experiencia completa se realizó por duplicado.

Una vez elegida la dosis de 10 kJ/m², se efectuó el tratamiento sobre frutos (como se indicó anteriormente) y se los almacenó junto a los frutos control a 0°C por 0, 7, 14, 21 y 28 días. A cada día de muestreo los frutos fueron retirados de la cámara de almacenamiento y luego de estimar el índice de daño, medir el color superficial y pérdida de peso, se retiraron las semillas, se cortaron y congelaron en N₂ líquido para finalmente conservarlos a -20°C hasta su análisis.

I.3.3. INDICE DE DAÑO POR FRIO

A cada día de muestreo los frutos fueron evaluados visualmente, observándose los síntomas de daño por frío tanto externa como internamente. Se elaboró una escala subjetiva de 1 a 4, que consideró los distintos síntomas de daño por frío observados para este fruto:

1. **Cambio del color:** se determinó el desarrollo del color (aparición visual) de acuerdo a la siguiente escala: 1 = 100% rojo; 2 = 90-100% rojo; 3 = 80-90% rojo; 4 = 80% rojo
2. **Decaimiento:** se estimó la susceptibilidad al desarrollo de mohos en la superficie y en el interior del fruto, utilizando la siguiente escala: 1= no hay desarrollo; 2 = desarrollado ligeramente; 3 = desarrollado moderadamente; 4 = muy desarrollado
3. **Escaldaduras:** Se determinó el porcentaje de depresiones blandas en la superficie del fruto de acuerdo a la siguiente escala: 1 = (0%) no hay desarrollo; 2 = (0-10%) desarrollo ligero; 3 = (10-20%) desarrollo moderado; 4 = (>20%) muy desarrollado
4. **Manchas:** se determinó el porcentaje de la superficie con punteado laminar y circular de color amarillento, 1 = 0% (no hay manchas); 2 = 0-10% (ligero); 3 = 10-20% (moderado); 4 = >20% (intenso)
5. **Pardeamiento de semilla:** medida como porcentaje de la semilla con cambio de color usando la siguiente escala: 1 = 0%; 2 = 0-5%; 3 = 5-10%; 4 = >10%
6. **Firmeza:** medida sensorial de la depresión de la fruta al tacto, en tres lugares del fruto: cerca del final del pedúnculo, en el centro, y en la base del fruto. Las tres mediciones fueron promediadas para obtener un valor para cada fruto. Para lo cual se usó la siguiente escala: 1 = firme (depresión suave); 2 = moderadamente firme (depresión moderada); 3 = ligeramente firme (fuerte depresión); 4 = blando (sin resistencia a la depresión) (Miller y Risse, 1986)

La evolución de cada síntoma de DPF se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de cada Síntoma de DPF} = \frac{(\text{nivel de daño}) * (\text{número de frutos por nivel})}{(\text{total de frutos evaluados})} \quad (I-1)$$

El índice de daño por frío (ID) se calculó como la sumatoria del índice de cada síntoma de DPF (ecuación I-1) evaluado, dividido por 6 (número de síntomas de DPF evaluados) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de daño (ID)} = \frac{\sum (\text{Índice de cada Síntoma de DPF})}{6} \quad (I-2)$$

Los niveles de daño reflejan lo expresado de acuerdo a la siguiente escala:

Índice de daño	Categoría	Descripción
1	Sin daño	Frutos sin ningún daño
2	Daño leve	Frutos con 90-100% color rojo, sin desarrollo de mohos, desarrollo ligero de escaldaduras y manchas, 0-5% semillas pardeadas y moderadamente firmes
3	Daño moderado	Frutos 80—90% rojos, desarrollo de mohos ligero a medio, moderado desarrollo de escaldaduras y manchas, 5-10% semillas pardeadas y ligeramente firmes
4	Daño severo	Frutos con <80% rojos, mohos muy desarrollado, escaldaduras y manchas >20% de la superficie, >10% semillas pardeadas y blando

I.3.4. PÉRDIDA DE PESO

Se procedió a pesar cada bandeja (3 frutos) al inicio y al término de cada periodo de almacenamiento. Se utilizó una balanza de precisión OHAUS Modelo Adventurer Pro AV4101. Se determinó la pérdida de peso como porcentaje del peso inicial.

I.3.5. COLOR SUPERFICIAL

El color superficial se evaluó empleando un colorímetro Konica Minolta Modelo CR-400, operado con software CR-400 Utility (Minolta, Tokio), midiendo los parámetros: L*, Cromo y ángulo Hue (H°). Las determinaciones se hicieron en tres lugares del fruto: en los hombros, en la zona ecuatorial, y en la base del fruto. Las mediciones fueron promediadas para obtener un valor para cada fruto. Se analizaron seis frutos para cada condición y tiempo de almacenamiento.

I.3.6. CONTENIDO DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

El contenido de malondialdehído (MDA) fue cuantificado como un índice de *peroxidación lipídica* usando el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según Du y Bramlage (1992) con ligeras modificaciones. Estos autores contemplan la corrección debida a interferencias provocadas por azúcares y sustancias no específicas. Un gramo de tejido congelado fue triturado con un molinillo De Longhi Modelo KG39, y homogenizado con 6 mL de

una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% p/v. La mezcla se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min y se separó el sobrenadante por filtración. A 1 mL de sobrenadante se añadió 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% p/v en TCA 20% p/v preparada diariamente. La mezcla fue sometida a ebullición durante 20 min y la reacción fue detenida colocando los tubos de ensayo en un baño de agua-hielo. Se centrifugó a 13.000 x g por 5 min y la absorbancia de la fase acuosa se midió a 532 nm y a 440 y 600 nm a fin de realizar las correcciones por las interferencias mencionadas. Se colocó agua destilada en lugar de extracto, y se lo trató de la misma manera para ser usado como blanco.

La cantidad del complejo MDA-TBA (color rojo) fue calculada como los nmoles/mL de malondialdehído (MDA) presentes en un gramo de tejido, de acuerdo con la siguiente ecuación (Du y Bramlage, 1992):

$$\text{nmol/mL MDA} = \left\{ \frac{(A_{532} - A_{600}) - [(A_{440} - A_{600}) \times (\epsilon_{\text{Fru } 532} / \epsilon_{\text{Fru } 440})]}{\epsilon_{\text{MDA}}} \right\} \times 10^6 \quad (1-3)$$

donde,

- A_{532} : absorbancia del complejo malondialdehído-TBA a 532 nm
- A_{600} : absorbancia de turbidez no específica a 600 nm
- A_{440} : absorbancia del complejo fructosa-TBA a 440 nm
- $\epsilon_{\text{Fru } 532}$: coeficiente de extinción de la fructosa a 532 nm (8,1 L/mol.cm)
- $\epsilon_{\text{Fru } 440}$: coeficiente de extinción de la fructosa a 440 nm (141 L/mol.cm)
- ϵ_{MDA} : coeficiente de extinción del malondialdehído (1,57x10⁵ L/mol.cm)

Los resultados se expresaron como contenido de TBARS (nmoles de MDA/g tejido). Para cada condición se realizaron dos moliendas, y dos extractos para cada una de ellas. Las medidas se realizaron por triplicado.

1.3.7. ANALISIS ESTADISTICO

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. 4. RESULTADOS Y DISCUSION

I.4.1. SELECCIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE UV-C

Se ensayaron dosis de radiación UV-C de 10 y 20 kJ/m² utilizando una temperatura de almacenamiento de 0°C. Se analizó la pérdida de peso, el desarrollo del color y el índice de daño por frío (ID) durante 21 días.

Se encontró que para los parámetros de color (Tabla I.1), los frutos control no mostraron variación en el parámetro L*, mientras que se observó una ligera disminución en el valor de H°. En tanto, los tratamientos con UV-C (10 y 20 kJ/m²) no influyeron significativamente sobre el desarrollo del color.

La pérdida de peso (Tabla I.1) de los frutos control fue de 1,7% con respecto al día inicial del almacenamiento. En los pimientos tratados con una dosis de 10 kJ/m², fue ligeramente inferior, mientras que los frutos tratados con 20 kJ/m² sufrieron la mayor pérdida de peso.

Tabla I.1. Parámetros de color (L* y H*), pérdida de peso (%) e índice de daño en frutos control y tratados (10 y 20 kJ/m²) durante 21 días de almacenamiento a 0°C.

Parametro	Almacenamiento (días)	Dosis UV-C		
		Control	10 kJ/m ²	20 kJ/m ²
Color	L*	0	35,5	35,5
		21	35,8	37,0
	H*	0	38	38
		21	34 *	38
Pérdida peso (%)	21	1,7	1,4 *	
Indice de Daño	21	3,3 *	2,3	

* indica que el valor es estadísticamente diferente del correspondiente control con una p < 0.05.

También se encontró que los frutos control presentaron síntomas de daño a los 7 días de almacenamiento, diferenciándose de los frutos tratados que mantenían una mejor calidad. Aún a los 14 días de almacenamiento los frutos tratados presentaron mejores características con respecto a los frutos control (datos no mostrados). A los 21 días de almacenamiento, los frutos control habían perdido totalmente su calidad alcanzando un valor de ID de 3,3; en cambio, los frutos tratados con 10 y 20 kJ/m² alcanzaron un ID de 2,3 (Tabla I.1). Hasta aquí, los parámetros analizados eran similares entre ambas dosis de luz UV y no permitían elegir una de ellas. La diferencia entre los dos tratamientos radicó en el tiempo en el que se alcanzaba la dosis, puesto que, se requirió 6 y 12 min de exposición para alcanzar las dosis de 10 y 20 kJ/m²,

respectivamente. Por lo tanto, una dosis de 10 kJ/m² fue más eficiente al requerir menor tiempo de exposición y ocasionar un menor gasto energético. Por lo tanto se eligió esta dosis para futuros ensayos.

1.4.2. Efecto del tratamiento UV-C sobre el desarrollo del daño por frío

Habiendo seleccionado una dosis de 10 kJ/m² se evaluó el desarrollo del DPF empleando un índice de daño (ID). En la figura 1.3, se expone la variación hallada en los ID de los frutos en función del tiempo de almacenamiento.

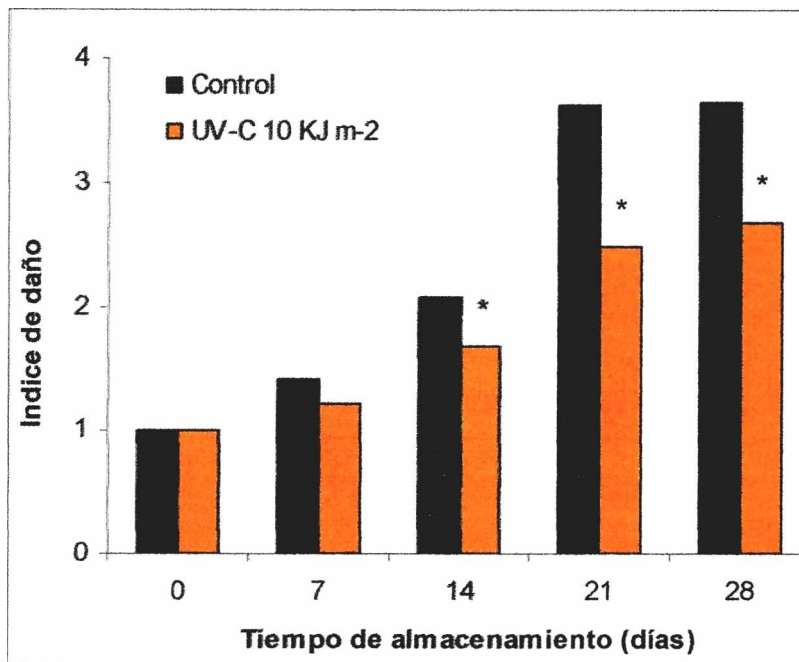


Figura 1.3. Variación del índice de daño de los pimientos en función del tiempo de almacenamiento a 0°C. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 0,23$

Los síntomas de DPF en los frutos control se observaron a partir del día 7 (Figura 1.3), tiempo en el que mostraron un ID = 1,4 que se incrementó hacia el día 21 (aproximadamente un 60%), a partir del cual permaneció prácticamente constante hasta el día 28. Es así que alcanzaron un daño entre *moderado* y *severo*, es decir, perdieron totalmente su calidad (ID= 3,7). Los frutos tratados presentaron un comportamiento similar pero con un daño de menor magnitud. Los frutos tratados alcanzaron un valor de ID= 2,5 a los 21 días de almacenamiento, aproximadamente un 31% menor respecto a los frutos control, y que corresponde a un daño entre *leve* y *moderado*, de acuerdo a la escala establecida (sección 1.3.3).

En la figura 1.4.A, se muestran los frutos luego de 7 días de almacenamiento y se observan escaldaduras en la superficie del fruto control en mayor magnitud respecto del fruto tratado.

En el día 14 se evidenció la pérdida de calidad de los frutos control, mientras que los tratados mantuvieron una mejor calidad tanto externa como interna. Para este tiempo de almacenamiento, los frutos control presentaron mayor porcentaje de escaldaduras y manchas distribuidas irregularmente en la superficie del fruto. Los frutos control mostraron una mayor pérdida de brillo, y firmeza al tacto y presentaron porcentajes elevados de semillas pardeadas, haciendo que la apariencia del fruto se vea disminuida considerablemente. En la figura 1.4.B, se muestran los frutos luego de 28 días y se puede observar la pérdida de calidad tanto en controles como tratados, aunque éstos últimos presentaron mejor aspecto.

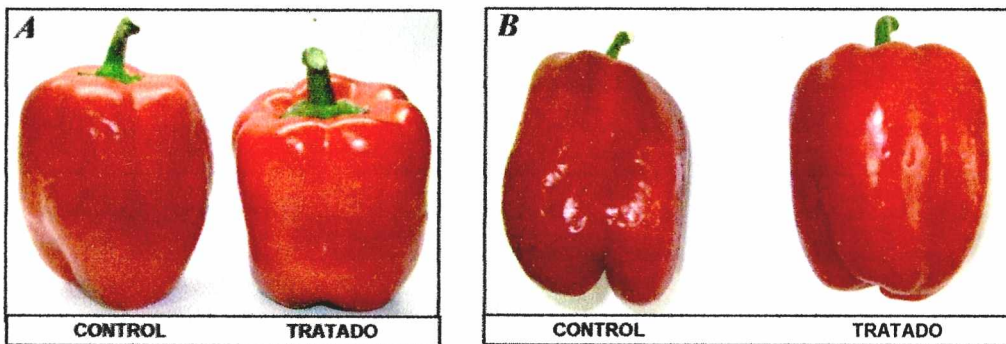


Figura 1.4. Desarrollo del DPF en pimientos tratados (10 kJ/m^2) y controles luego de 7 (A) y 28 (B) días de almacenamiento a 0°C .

Los resultados obtenidos aquí coinciden con los obtenidos por Vicente y col. (2005) que observaron una reducción del DPF en pimientos cv Zafiro aplicando una dosis de 7 kJ/m^2 . Efectos similares del tratamiento con bajas dosis de UV-C han sido reportados en mango (González-Aguilar y col., 2007a), duraznos (González-Aguilar y col., 2004), donde el tratamiento UV-C retrasó el desarrollo de hongos, la aparición de síntomas de DPF y mantuvo la calidad de los frutos tratados por periodos más largos.

1.4.3. Efecto del tratamiento UV-C sobre la pérdida de peso

Se evaluó la pérdida de peso al final de cada tiempo de almacenamiento. Como se puede apreciar en la figura 1.5, el tratamiento con UV-C provocó menor pérdida de peso. Los frutos tratados presentaron un comportamiento similar a los controles pero aumentaron la pérdida de peso en menor proporción. Durante el almacenamiento la pérdida de peso de los frutos

aumentó de forma continua alcanzando un 4,1 y 2,4% en los frutos controles y tratados, respectivamente, al final del almacenamiento.

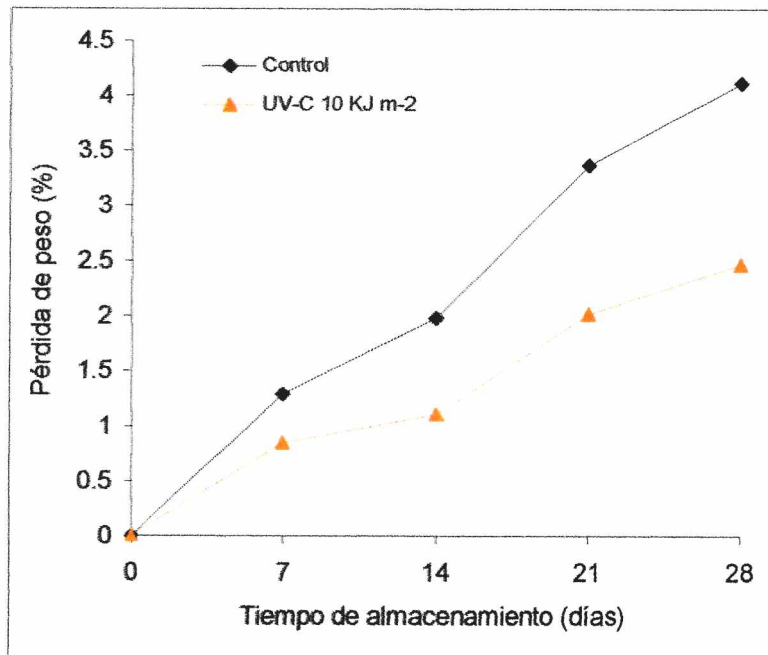


Figura 1.5. Pérdida de peso porcentual durante el tiempo de almacenamiento. $LSD_{0,05} = 0,96$

Resultados similares fueron reportados en duraznos (González-Aguilar y col., 2004), pimiento cv Zafiro (Vicente y col., 2005) y en tunas (Piga y col., 1998) tratados con UV-C. Probablemente, esta menor pérdida de peso de los frutos tratados se deba, a la mejor integridad del tejido respecto de los frutos control.

1.4.4. Efecto del tratamiento UV-C sobre el color superficial

Los cambios en el color superficial durante el almacenamiento se evaluaron a través de los valores de luminosidad (L^*), intensidad de color (Cr^*) y el ángulo Hue (H°).

Inmediatamente después del tratamiento no se observaron diferencias en los parámetros de color evaluados entre los frutos control y los tratados. Inicialmente los frutos tenían valores de $L^* = 36,7$; $H^\circ = 41,4$ y $Cr^* = 26,2$ para un pimiento con grado de madurez de 80-90% rojo en la superficie.

La luminosidad (valor L^*) en los frutos controles y tratados mostró un ligero incremento hacia el día 7, para luego permanecer sin grandes variaciones a lo largo del almacenamiento (Figura 1.6). Prácticamente no se observaron diferencias significativas entre los valores de L^* de

frutos controles y tratados. Resultados similares se observaron en pimientos tratados con 7 kJ/m² (Vicente y col., 2005).

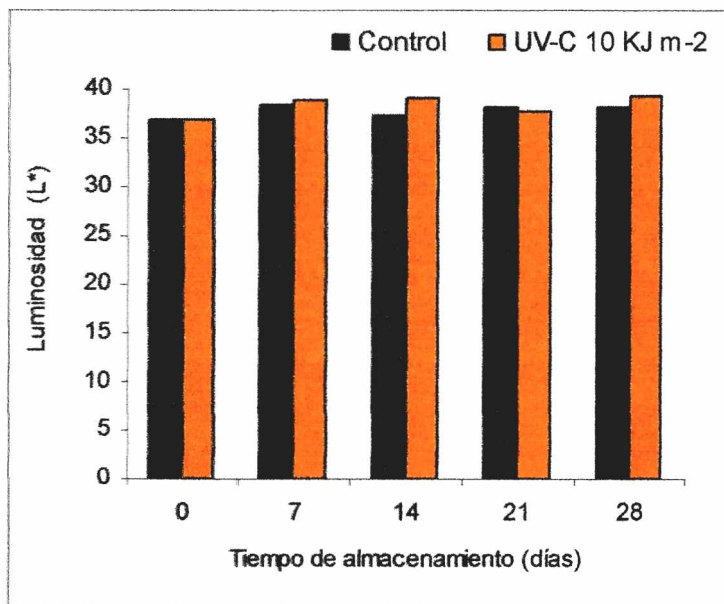


Figura 1.6. Cambios en la luminosidad (L*) en frutos controles y tratados durante el almacenamiento a 0°C. LSD_{0,05} = 0,9

El ángulo Hue (valor H°) disminuyó ligeramente tanto en frutos controles como tratados, que no difieren entre sí (figura 1.7).

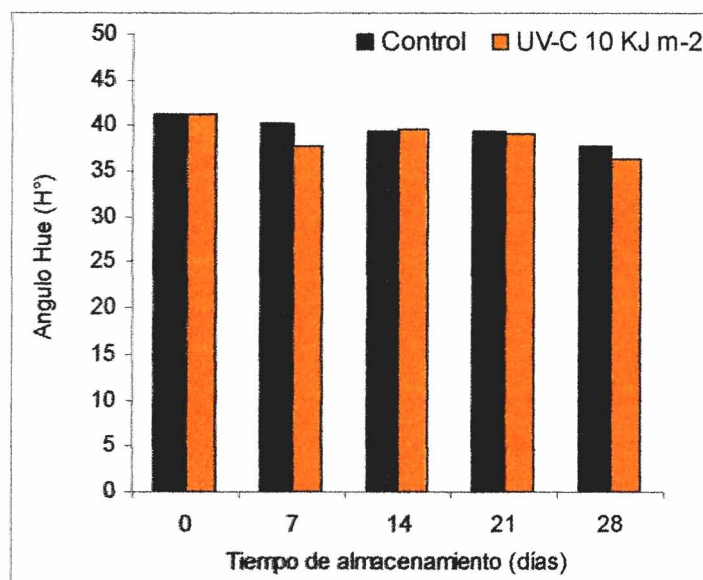


Figura 1.7. Cambios en el parámetro de color Hue (H°) en frutos controles y tratados durante el almacenamiento a 0°C. LSD_{0,05} = 3,1

La intensidad de color (Cr^*) aumentó hasta el día 7 tanto en controles como en tratados, a partir del cual se mantuvo constante (figura 1.8) hacia el final del almacenamiento. Esto denota que el color rojo inicial se intensificó ligeramente, probablemente debido al avance de la maduración. En estudios efectuados con tomates con estadio de madurez más temprano (verde-maduro) que el empleado aquí con pimientos, se halló un retraso en el desarrollo de color y en el ablandamiento al tratar los frutos con $3,7 \text{ kJ m}^{-2}$ (Maharaj y col., 1999). En ese caso, los autores encontraron también un retardo del climaterio de los tomates ensayados, por lo que entonces se considera que el avance de la maduración se había visto sensiblemente retrasado.

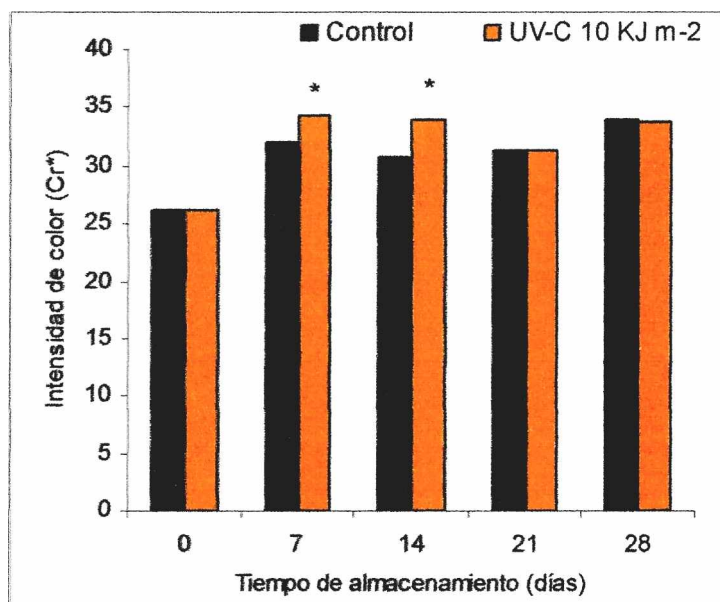


Figura 1.8. Cambios en la intensidad de color (Cr^*) en frutos controles y tratados durante el almacenamiento a 0°C . El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $\text{LSD}_{0,05} = 1,8$

En este trabajo, a lo largo del almacenamiento, si bien se observaron algunos cambios en los parámetros de color de los pimientos analizados, estos no fueron muy marcados. Tampoco hubo una incidencia del tratamiento UV-C sobre los mismos, lo cual indicaría que el tratamiento UV-C no tuvo efecto sobre la velocidad de maduración, medida por los cambios de color, probablemente porque el grado de madurez inicial del fruto fue elevado (mayor al 80% de desarrollo del color).

1.4.5. Efecto del tratamiento UV-C sobre el contenido de TBARS

Se utilizó la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como un indicador de peroxidación lipídica (PL) (figura 1.9). Inmediatamente después del tratamiento con UV-C se indujo un ligero incremento en el contenido de TBARS. Otros autores también hallaron un incremento de las TBARS al trabajar en plantines de colza (*Brassica napus*) expuestos a radiación UV-B y C (Nasibi y M-Kalantari, 2005) y hojas de arroz (Dai y col., 1997). Un aumento de la PL ha sido observado también en trigo (Cafaro, 2005), pepino (Shi y col., 2006) y hojas de arroz (Kuo y Kao., 2003), sometidos a diversos tipos de estrés abiótico; lo que sugiere que cualquier tipo de estrés induciría el aumento de PL. El incremento en las TBARS a tiempos cortos en frutos tratados con UV-C se ha asociado con la actividad de la enzima lipoxigenasa (LOX) (González-Aguilar y col., 2007a). De todos modos parecería más probable que el rápido incremento en la PL se asociaría a la exacerbada producción de EROs que ha sido descrita en tejidos expuestos a la radiación UV-C. A pesar de esto resulta difícil determinar, desde un punto de vista fisiológico, que grado de peroxidación resulta en disfunciones importantes en el funcionamiento normal de las membranas. De hecho este incremento inicial en la peroxidación no se traduce, al menos, en alteraciones sintomáticas.

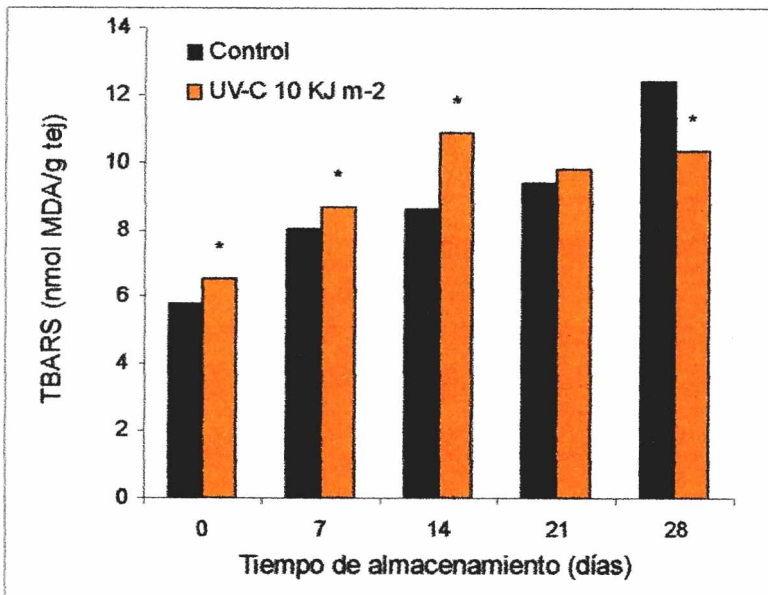


Figura 1.9. Variación de la peroxidación lipídica, determinado a través de la medida de TBARS, (nmol malondialdehído/g tejido) en función del tiempo de almacenamiento a 0°C sobre pimientos control y tratados con radiación UV-C. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 0,59$

Los frutos tratados mantuvieron mayores niveles de TBARS que los controles incluso luego de 14 d de almacenamiento. Sin embargo, y como se mencionó con anterioridad, en

etapas intermedias del DPF, los frutos controles comenzaron a mostrar una mayor sintomatología. La peroxidación lipídica determinada a partir de las TBARS ha sido utilizada en muchos casos como indicador de envejecimiento, daño oxidativo e incluso daño por frío. Los resultados claramente sugieren que la utilización de este parámetro debe ser analizada con precaución. Al menos en el caso de pimiento se observa que este parámetro no correlaciona con la manifestación de síntomas de DPF. Si bien esto podría sugerir que el DPF no se relaciona con el daño oxidativo en membranas, no pueden excluirse las siguientes posibilidades:

- *La peroxidación de membranas no es determinante en las disfunciones iniciales en el DPF en pimiento:* Otros constituyentes celulares como proteínas y/o ácidos nucleicos son blancos de las EROs que se traducen en las alteraciones iniciales a nivel celular.
- *La iniciación del DPF se asocia con el daño oxidativo a nivel de las membranas de ciertos compartimientos subcelulares específicos:* La determinación global de TBARS realizada impide analizar si en particular el daño funcional a nivel de estructuras subcelulares específicas (ej. membrana mitocondrial) no es más marcada en los frutos controles que en los sometidos a los tratamientos UV-C. De hecho existen trabajos previos que muestran que uno de los cambios observados en pimiento durante el almacenamiento a temperaturas de daño por frío es el incremento en la producción de superóxido a nivel mitocondrial (Purvis y col., 1995). En ese sentido resultaría de interés realizar estudios más detallados para determinar si efectivamente las membranas mitocondriales son un blanco primario en el desarrollo de DPF.

En los días finales del almacenamiento, el contenido de TBARS aumentó más marcadamente en los frutos control y luego de 28 d a 0°C éstos presentaron niveles significativamente superiores a los observados en los frutos tratados con UV-C. Barka y col., (2000) evaluaron el efecto de la radiación UV-C sobre marcadores de PL (que incluyen aldehídos, pentano, etano y MDA entre otros) durante la maduración de tomate, y encontraron también dos diferentes fases de respuesta. Una primer fase donde existe un incremento en los niveles de marcadores de PL en respuesta a la radiación y una segunda fase donde el nivel de los marcadores de PL llegó a ser menor en los frutos tratados que en los controles, sugiriendo la inducción de un mecanismo de defensa, que probablemente involucre la producción de antioxidantes y/o la activación de enzimas antioxidantes.

I. 5. CONCLUSIONES

- Los tratamientos con UV-C (10 y 20 kJ/m²) retrasaron los síntomas de DPF en pimientos cv Comago almacenados a 0°C, pero el tratamiento con 10 kJ/m² fue el elegido para ulteriores ensayos debido al menor tiempo de exposición a la radiación y al consecuente menor gasto energético.
- El color no se vio afectado por los tratamientos UV-C realizados. Por el contrario, los tratamientos redujeron la pérdida de peso durante el almacenamiento lo cual probablemente se asocia con una mayor manutención de la integridad de los tejidos en los frutos tratados (menor incidencia de escaldaduras y otras lesiones superficiales) respecto a los frutos control.
- La peroxidación lipídica determinada a partir de las TBARS ha sido utilizada en muchos casos como indicador de envejecimiento y/o daño oxidativo a nivel celular. Los resultados hallados en el caso de pimiento muestran que si bien este parámetro presentó incrementos sostenidos durante el almacenamiento prolongado, no correlacionó con la manifestación de síntomas de DPF. De hecho los tratamientos UV-C provocaron un incremento en los niveles de TBARS y más aún luego de 7 o 14 d de almacenamiento, cuando se inició la manifestación de los síntomas, los niveles de peroxidación lipídica continuaban siendo mayores en los frutos tratados con UV-C.
- Las respuestas observadas en la evolución de las TBARS sugieren 2 fases diferenciadas luego de los tratamientos y hasta el final del almacenamiento. Por un lado a tiempos cortos los tratamientos UV-C (que muestran una significativa reducción en el DPF) sufren un incremento en la peroxidación lipídica y posteriormente ésta continúa incrementándose pero a menor velocidad que en los frutos control. En ese sentido resulta de interés analizar los diferentes componentes del sistema de defensa antioxidante para poder avanzar en la comprensión de las respuestas fisiológicas asociadas con la exposición de tejidos vegetales a la radiación UV-C.



CAPITULO II

EFECTO DEL TRATAMIENTO UV-C SOBRE LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

II. 1. INTRODUCCION

II. 1.1. LOS RADICALES LIBRES

Radical libre es una especie que posee uno o más electrones no apareados. Esta condición, químicamente muy inestable, lo vuelve muy reactivo por lo que incrementa su tendencia a quitar electrones de moléculas vecinas oxidándolas y convirtiéndolas a su vez en nuevos radicales libres ávidos por electrones. Se genera así una reacción en cadena.

El concepto químico de radical libre estaba bien desarrollado en 1954, cuando Gerschman (fisióloga y bióloga argentina, 1904-1986) postuló a los radicales libres del oxígeno (O_2^- y HO^{\cdot}) como responsables del mecanismo molecular de la toxicidad del oxígeno y la radiación. El descubrimiento de la superóxido dismutasa por McCord y Fridovich (1969) abrió la etapa actual de conocimiento del papel biológico de los radicales libres (Boveris, 2005).

II. 1.1.1. Generación de radicales libres

Los radicales libres derivados del oxígeno son llamados ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs). Son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico. Estas moléculas son el resultado de la excitación del O_2 a la forma de oxígeno singulete (1O_2), o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Figura II-1). En contraste con el oxígeno atmosférico, las EROs son capaces de oxidar sin restricción, a varios componentes celulares (ADN, proteínas y lípidos) y pueden llevar a la destrucción oxidativa de la célula (Mittler, 2002).

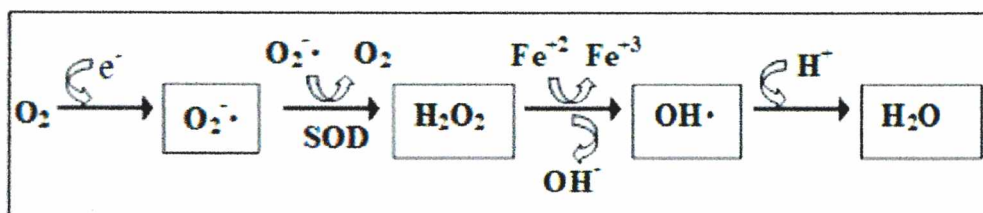


Figura II-1. Esquema de producción de EROs (fracción de un esquema extraído de Castillo y col., 2001).

SOD= Superóxido dismutasa

Las EROs se producen normalmente como parte del metabolismo celular. Son fuentes principales de producción de EROs los cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias (Zimmermann

y Zentgraf, 2005). También son fuentes de formación de EROs, reacciones inducidas durante la exposición a diferentes situaciones de estrés abiótico (Hideg, 2004) como el producido por la radiación UV, la exposición a bajas o altas temperaturas, el daño mecánico, y la disminución de la presión parcial de oxígeno, entre otros (Blokhina y col., 2002), o bióticos como la invasión de patógenos.

Las EROs son moléculas extremadamente reactivas y resultan, en niveles elevados, citotóxicas para cualquier organismo ya que pueden reaccionar con ácidos grasos insaturados y causar peroxidación de lípidos de membrana celular o membranas de organelas intracelulares. El daño de membranas intracelulares puede influir en las reacciones de respiración de la mitocondria. También altas concentraciones de EROs pueden afectar el sistema fotosintético produciendo fotoinhibición (Mittler, 2002).

Los compuestos excitados por la luz (como por ejemplo la clorofila, flavinas, quinonas) pueden transferir su energía al O_2 y formar el 1O_2 . También, en presencia de una sustancia reductora (que cede fácilmente electrones) el compuesto puede reducirse y con el O_2 formar el **ión superóxido** (O_2^-). El 1O_2 también se forma en la dismutación espontánea del O_2^- , y de la descomposición del **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2).

El 1O_2 es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de compuestos celulares. El producido fuera de las células (apoplasto) reacciona fundamentalmente con la membrana plasmática; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce. No obstante se considera que el H_2O_2 puede difundir a través de los compartimentos celulares. Altas concentraciones de H_2O_2 pueden activar la *muerte celular programada*. Bajas concentraciones de H_2O_2 pueden actuar como moléculas de transmisión de señales para que la planta reaccione frente a diferentes tipos de estrés bióticos y/o abióticos. Por ejemplo, pueden actuar como señal para la activación de la expresión de genes en respuesta al ataque de patógenos (Blokhina y col., 2002).

Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , entonces se fragmenta y forma el **radical hidroxilo** (HO^\cdot) y el **ión hidroxilo** (HO^-). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio, el HO^\cdot es uno de los compuestos más reactivos que existen ya que afecta a macromoléculas provocando lesiones y mutaciones en el ADN, de forma irreversible, lo que conlleva a la muerte celular.

En 1985, Sies propuso el concepto de "estrés oxidativo" como un desbalance, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal (Sies, 1985).

Cuando la concentración de EROs supera la capacidad del sistema antioxidante de secuestrar estas moléculas, el tejido se encuentra en un estado de “estrés oxidativo”, con las consecuencias que se producen por una concentración excesiva de EROs, descritas anteriormente.

Cuando se presenta el estrés, las plantas reaccionan modificando la expresión de diversos genes. En esta fase de alarma, comienza la activación de los mecanismos para hacer frente al estrés y así, los cambios que se producen permiten a la planta alcanzar un nuevo estado fisiológico óptimo para las actuales condiciones.

Para controlar los niveles de EROs y la protección celular bajo condiciones de estrés, los tejidos de las plantas contienen algunas enzimas secuestradoras de EROs (superóxido dismutasa –SOD-, catalasa –CAT-, peroxidasas –POX- y glutatión reductasa –GR- ascorbato peroxidasa -APX), de detoxificación de productos de peroxidación lipídica (glutatión S-transferasas, etc.) y una red de compuestos antioxidantes de bajo peso molecular (ácido ascórbico, glutatión reducido, tocoferoles, compuestos fenólicos y carotenoides). Si bien los carotenoides resultan abundantes en pimiento, a nivel celular se encuentran compartimentalizados dentro de estructuras formadas por glóbulos y un sistema membranoso.

II. 1.2. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o inhibir la oxidación de lípidos o de moléculas por inhibición de la iniciación o propagación de las reacciones de oxidación en cadena (chain-breaking) (Javanmardi y col., 2003). Los antioxidantes han sido agrupados en tres sistemas (figura II-2):

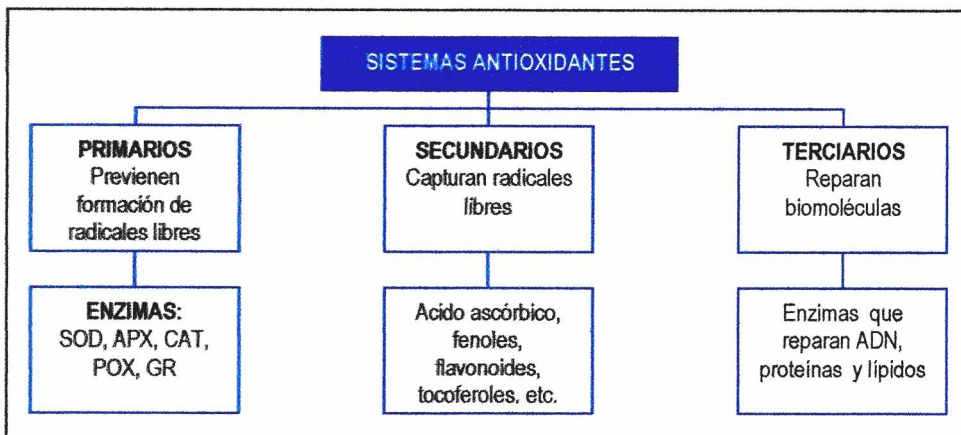


Figura II-2. Sistemas antioxidantes (diagrama extraído de Anónimo, 2001).

II. 1.2.1. COMPUESTOS FENOLICOS

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad englobando más de 8.000 compuestos distintos. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez-Valverde y col., 2000).

Químicamente, los compuestos fenólicos en los vegetales, son sustancias químicas que poseen un anillo aromático (benceno) con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, incluyendo también a los carotenoides y flavonoides. Su forma más frecuente en tejidos leñosos es la de polímeros altamente resistentes a la degradación e insoluble (lignina).

El interés en los compuestos fenólicos ha sido recientemente explorado por investigaciones que comprueban su actividad antioxidante (Beta, 2005), la cual es debida principalmente a sus propiedades redox, donde juegan un rol importante en la absorción y neutralización de radicales libres, secuestro del oxígeno singulete y triplete o la descomposición de peróxidos (Javanmardi y col., 2003). Estas que se dan, solo si, el compuesto cumple con dos condiciones básicas: la primera es que pueda retrasar, enlentecer o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre y la segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores.

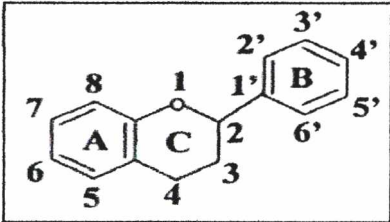
Estas propiedades han sido evidenciadas por numerosas investigaciones de medición de la actividad antioxidante *in vitro* (Ou y col., 2001). *In vivo*, la protección antioxidante atribuida a los polifenoles puede ser monitoreada a través de los niveles de biomarcadores, como el malondialdehído, que está asociado con la peroxidación lipídica, o con el 8-oxo-7,8-dihidroguanina, un indicador de daño oxidativo a las bases nitrogenadas del ADN (Silva y col., 2007).

En pimientos están presentes compuestos fenólicos, cuya composición no ha sido completamente estudiada, se han encontrado derivados del ácido cinámico y flavonoides (Materska y Perucka, 2005).

II. 1.2.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides son polifenoles derivados del benzo- γ -pirano, conformados por un anillo fenólico y pirano (figura II-3a), existen un sinnúmero de compuestos derivados de esta estructura según la distribución de los sustituyentes (figura II-3b).

a)



b)

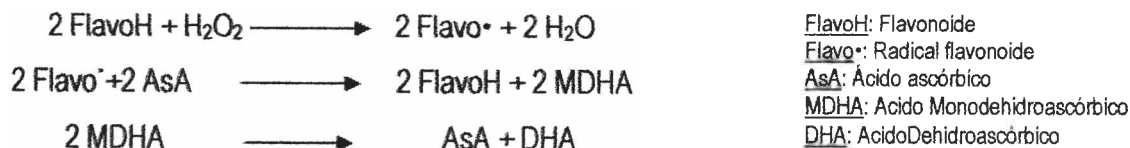
Clases	Flavonoides	Sustituyentes									
		2	3	4	5	6	7	8	4'	5'	6'
Flavan-3-oles	(-)-Galangina	---	OH	---	OH	---	OH	OH	OH	H	---
	Antocianidinas	---	OH	---	OH	---	OH	OH	OH	H	---
Flavonas	Quercetina	---	OH	---	OH	---	OH	OH	H	H	---
	Apigenina	---	H	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Diosmina	---	H	---	OH	---	OR,	OH	OMe	H	---
Flavonoles	Luteolina	---	H	---	OH	---	OH	OH	OH	H	---
	Naringina	---	H	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Naringina	---	H	---	OH	---	OR,	H	OH	H	---
	Hesperetina	---	H	---	OH	---	OH	OH	OMe	H	---
Chalconas	Hesperidina	---	H	---	OH	---	OR,	OH	OMe	H	---
	Fisetina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	H	OH	OH
Flavan-3-oles	Fisetina	OR,	OR,	H	H	OH	OH	H	H	OH	OH
	Quercetina	---	OH	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Kaempferol	---	OH	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Muriceína	---	OH	---	OH	---	OH	OH	OH	OH	---
	Fisetina	---	OH	---	H	---	OH	OH	OH	H	---
Morina	---	OH	---	OH	---	OH	H	OH	H	---	

Figura II-3. Estructura básica de los flavonoides y esquema de numeración (a). El tipo de sustituyente que posea en cada posición determina las clases y subclases de flavonoides que se detallan en la tabla b.

Las cuatro clases más extensas de flavonoides son las 4-oxoflavonoides (flavonas, flavonoles) antocianinas, isoflavonas y los flavan-3-oles (catequinas y taninos) (Koo y Suhaila, 2001).

Existe una relación directa entre la actividad antioxidante y la estructura de los flavonoides (Heim y col., 2002), ya que esta actividad es el resultado de la combinación de la capacidad de estas estructuras de secuestrar radicales libres y de quelante del hierro, además de la inhibición de oxidasas como la lipoxigenasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa, evitando la proliferación de EROs. También inhiben enzimas involucradas indirectamente en procesos oxidativos como la fosfolipasa A, y estimulan enzimas que actúan en estos procesos, como CAT y SOD. De esta forma, los flavonoides interfieren tanto en las reacciones de propagación como de formación de radicales libres (Pérez-Trueba, 2003). Existe evidencia de que los

flavonoides actuarían en combinación con el ácido ascórbico para regenerar a éste (Sakihama y col., 2002). Es así que se han planteado mecanismos tales como:



donde el MDHA y DHA son reducidos a AsA vía el ciclo de Halliwell-Asada, que se discutirá más adelante.

Los flavonoides que se encontraron en mayor cantidad en pimiento verde fueron quercetina y miricetina (Koo y Suhaila, 2001; Materska y Perucka, 2005) y en pimiento rojo glicósidos de ácidos ferúlico y sinápico, (Materska y Perucka, 2005).

II. 1.2.3. ACIDO ASCORBICO (AsA)

El **ácido ascórbico** es un ácido orgánico, de reconocida actividad antioxidante. Walter Haworth (premio Nobel de química, 1937) determinó la estructura del ácido ascórbico, y Albert von Szent-Gyorgyi Nagyrápoly (Nobel de medicina, 1937) estableció sus funciones biológicas.

El ser humano, es incapaz de sintetizar la vitamina C (ácido ascórbico) por lo que debe ingerirla a través de los alimentos. La vitamina C es sensible a la luz, al oxígeno y a la temperatura, por ello es recomendable el consumo de frutas y verduras crudas o poco cocidas. Por estas razones, será un objetivo la aplicación de tecnologías que permitan retener el máximo contenido de vitamina C durante el procesado y almacenamiento del producto.

El AsA es especialmente sensible a la oxidación cuando la reacción está catalizada por iones metálicos como el Cu^{2+} y el Fe^{3+} . El calor y la luz aceleran el proceso, y factores como el pH, la concentración de oxígeno y la actividad de agua influyen en la velocidad de reacción (Fennema, 2000).

La vitamina C es muy sensible y se destruye cuando el producto es sujeto a condiciones adversas de manipulación y almacenamiento. La pérdida de esta vitamina aumenta en largos tiempos de almacenamiento, altas temperaturas, baja humedad relativa, daño físico del producto y daño por frío (Tatsumi y col., 2006).

Las funciones del ácido ascórbico están basadas en sus propiedades de óxido-reducción: actúa como cofactor enzimático y puede reaccionar fácilmente con radicales libres actuando como antioxidante y pasando el mismo a ser un radical ascorbilo (monodehidroascorbato), que rápidamente se descompone para producir ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico. Mediante

estas reacciones, la vitamina C captura radicales libres potencialmente tóxicos como los radicales superóxido o hidroxilos (Arrigoni y De Tullio, 2002).

Los frutos y hortalizas que tienden a ser las mayores fuentes de vitamina C son, entre otros: el pimiento (rojo) y los cítricos, las fresas, la coliflor, el repollo.

Por su importancia nutricional, el ácido ascórbico ha sido ampliamente cuantificado en las plantas, sin embargo, su función en la célula no ha sido totalmente dilucidada.

Aparentemente la síntesis del AsA ocurre en el citosol, por translocadores específicos de ascorbato. El L-AsA (el isómero con propiedades biológicas) y por mucho tiempo existió controversia con respecto a la secuencia de reacciones que lo sintetizan (Loweus, 1988). La síntesis de AsA en plantas ha sido elucidada en forma relativamente reciente y ocurre a partir de la L-galactosa (Smimoff y Wheeler, 2000; Smimoff, 2000). Otra ruta alternativa que utiliza al ácido galacturónico (que podría ser reciclado de la pectina de las paredes celulares) ha sido descrita en frutos (Agius y col., 2003). Una vez sintetizado el AsA se distribuye por diversos compartimentos celulares donde participa en aspectos tan importantes como regulación del crecimiento y protección contra agentes oxidantes de origen endógeno o ambiental.

Cuando el AsA se oxida, se produce un radical relativamente estable denominado *monodehidroascorbato*, la pérdida de un nuevo electrón da lugar a una forma más oxidada denominada *dehidroascorbato*. Estas dos formas oxidadas (figura II-4) son utilizadas por la célula para regenerar ácido ascórbico mediante la acción de enzimas solubles o ligadas a membrana que emplean al glutatión como donador de electrones. Esto es parte del ciclo de Halliwell-Asada que se detallará posteriormente.



Figura II-4. Acido Ascórbico y sus metabolitos.

II. 1.2.3.1. Ciclo de Halliwell-Asada

Cerca del 20-40% del contenido celular de AsA se encuentra en el cloroplasto, esta organela contiene todas las enzimas para regenerar ascorbato reducido a partir de sus productos de oxidación. Un esquema del ciclo de Halliwell-Asada se muestra en la figura II-5.

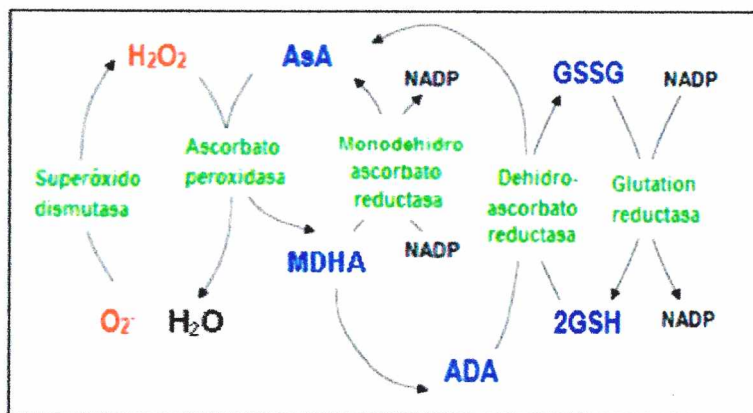


Figura II-5. Ciclo Halliwell-Asada (Mittler, 2002). Las EROs están señaladas de color rojo, los antioxidantes en azul y las enzimas antioxidantes en verde. Abreviaturas: MDHA, Acido monodehidroascórbico; ADA, ácido dehidroascórbico; GSH, Glutatión reducido; GSSG, Glutatión oxidado.

El ión superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por dismutación espontánea o por la enzima SOD. El H_2O_2 es tomado por la enzima ascorbato peroxidasa (Asada, 1992) que consume AsA y lo reduce a monodehidroascorbato (MDHA) (McKersie, 1996; Mittler, 2002). El monodehidroascorbato tiene dos vías de regeneración, una catalizada por la enzima monodehidroascorbato reductasa y la otra vía con el glutatión y dehidroascorbato reductasa. El NADPH actúa como donador final de electrones. Más allá de la presencia de cantidades elevadas de AsA en los plástidos este compuesto también se encuentra en el citosol, mitocondria, apoplasto y peroxisomas (Mittler, 2002).

II. 1.2.4. ACIDO DEHIDROASCORBICO (ADA)

El término *vitamina C* es usado como un descriptor para todos los compuestos que exhiben la actividad biológica del ácido ascórbico. Este grupo de compuestos incluye ésteres del ácido ascórbico, formas sintéticas como el ácido 6-desoxi-L-ascórbico. En los frutos se considera como vitamina C la suma del contenido de ácido ascórbico (AsA) más el ácido dehidroascórbico (ADA) (Odrizola-Serrano y col., 2007)

Si bien el AsA es la principal forma biológicamente activa, el ADA exhibe también actividad biológica, ya que puede ser fácilmente convertido a AsA en el cuerpo humano, por ello es importante cuantificar la concentración tanto de AsA como de ADA (Lee y Kader, 2000). En la sangre y los tejidos periféricos, el AsA es rápidamente oxidado a ADA según la reacción de la figura II-6.

El ADA es inestable en solución acuosa, a pH y temperatura fisiológicos. In vivo, es rápidamente transportado al interior de las células y reducido inmediatamente a AsA.

La concentración de ADA en los alimentos es, casi siempre, sustancialmente más baja que la de AsA y depende de las velocidades de oxidación del ascorbato y de la hidrólisis de ADA a ácido 2,3-dicetogulónico (Fennema, 2000).

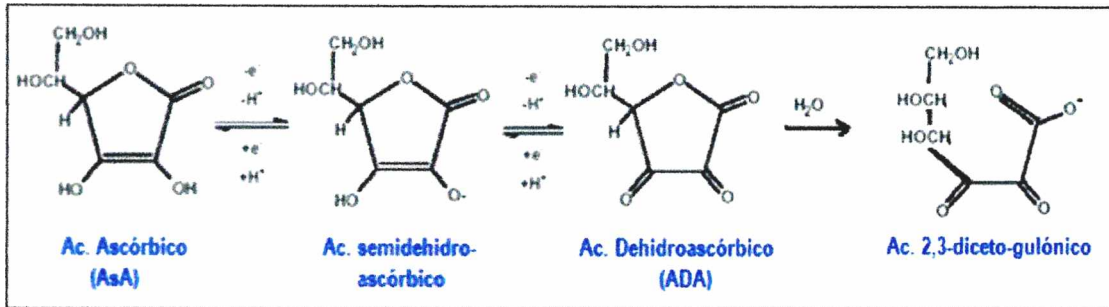


Figura II-6. Oxidación de Acido Ascórbico a Ac. 2,3-diceto-gulónico.

En la mayoría de las especies vegetales el ADA presenta un contenido menor al 10% de la vitamina C total, pero esta concentración tiende a incrementarse durante el almacenamiento (Wills y col., 1984). Lee y Kader (2000) compararon las concentraciones de AsA y ADA en diferentes especies de frutos y vegetales, analizando los factores de pre y poscosecha que influyen en el contenido de estos compuestos. Factores precosecha como la intensidad lumínica y la temperatura determinan el contenido final de vitamina C en el producto. En general la mayor intercepción de radiación se asocia con contenidos más elevados de vitamina C. Procedimientos de manipulación durante la cosecha y poscosecha influyen en la calidad nutricional de frutos y vegetales. Las pérdidas de vitamina C continúan a lo largo del procesamiento, cocción y almacenamiento de los productos. Por ello es necesario establecer condiciones adecuadas en la manipulación poscosecha y su potencial impacto sobre la calidad de frutos y vegetales, principalmente sobre productos que son considerados fuente de vitamina C.

II.2 OBJETIVO

Estudiar el efecto del tratamiento con radiación UV-C (10 kJ/m²) sobre el contenido de compuestos antioxidantes no enzimáticos: fenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico y dehidroascórbico y la capacidad anti-radical durante el almacenamiento de los frutos a 0°C.

II.3 MATERIALES Y METODOS

II.3.1. MATERIAL VEGETAL

Las experiencias se llevaron a cabo empleando pimientos tipo blocky (*Capsicum annum* L., cv Cornago), que se cultivaron, cosecharon y acondicionaron tal como se describió en la sección I.3.1.

II.3.2. TRATAMIENTO CON LUZ UV-C

Los frutos fueron irradiados aplicando una dosis de 10 kJ/m² y almacenados, según se describiera en la sección I.3.2. A los días 0, 7, 14, 21 y 28 los frutos fueron retirados de la cámara de almacenamiento. Luego de ser evaluados visualmente se retiraron las semillas, se cortaron y congelaron en N₂ líquido para finalmente conservarlos a -20°C hasta su posterior análisis.

II.3.3. CONTENIDO DE FENOLES Y FLAVONOIDES

II.3.3.1 Preparación del extracto

Se tomaron 2 g de tejido congelado, se trituraron con un molinillo De Longhi Modelo KG39, y homogenizaron en 6 mL de etanol. La suspensión obtenida se sometió a agitación durante 60 min, se centrifugó a 9.000 x g durante 15 min, se separó el sobrenadante por filtración y se almacenó a -80°C hasta su análisis. La preparación del extracto se llevó a cabo a 4°C.

Los extractos fueron empleados para la determinación de flavonoides y fenoles totales. Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado se realizaron dos moliendas y un duplicado de extractos de cada una de ellas.

II.3.3.2 Determinación del contenido de FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales fue medido usando el método colorimétrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con ligeras modificaciones. Una muestra de 40 µL de extracto fue transferido a un tubo que contenía 2360 µL de agua bidestilada, luego fueron añadidos a la mezcla 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N), se homogenizó, tapó y mantuvo a temperatura ambiente durante 3 min. Entonces se adicionaron 400 µL de Na₂CO₃ 2% p/v en NaOH 0,1 N completando un volumen final de 3 mL con agua bidestilada. La

absorbancia de la solución a 760 nm fue medida al completar 60 min de reacción en un espectrofotómetro Beckman Du650. La concentración de fenoles totales fue calculada empleando una curva de calibración con catequina de 8 a 22 µg en el volumen final de reacción. Los resultados se expresaron como mg catequina por gramo de tejido. Las medidas se realizaron por triplicado.

II.3.3.3 Determinación del contenido de FLAVONOIDES

El contenido total de flavonoides fue determinado mediante un ensayo espectrofotométrico según Shin y col., (2007) con ligeras modificaciones. Una alícuota de 450 µL de extracto fue transferida a un tubo que contenía 400 µL de agua bidestilada, se añadieron 38 µL de NaNO₂ al 5% p/v, manteniéndose en reposo a temperatura ambiente durante 5 min, luego se agregaron 38 µL de AlCl₃ al 10% p/v, manteniéndose en reposo durante 6 min, entonces se añadieron 250 µL de NaOH 1 M y se completó un volumen de 1250 µL con agua bidestilada. La absorbancia de la solución a 510 nm fue medida inmediatamente en un espectrofotómetro Beckman Du650. La concentración de flavonoides fue calculada usando una curva de calibración con catequina de 8 a 25 µg en el volumen final de reacción. Los resultados se expresaron como µg catequina por gramo de tejido. Las medidas se realizaron por triplicado.

II. 3.4. CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO (AsA) y ACIDO DEHIDROASCORBICO (ADA)

II.3.4.1 Extracción

El contenido de AsA fue determinado según el procedimiento descrito por Viña y Chaves (2006) con ligeras modificaciones. Un gramo de tejido de pimiento congelado fue triturado y añadido a 6 mL de una solución acuosa de ácido cítrico al 3% p/v. La mezcla se agitó por 10 min en baño de hielo y protegido de la luz, luego se centrifugó a 14.000 x g, 10 min y 4°C. El sobrenadante se separó y filtró a través de un filtro de 45 µm y fue analizado inmediatamente o congelado en N₂ líquido y conservado a -80°C hasta su análisis (no más de 7 días).

Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado se realizaron dos moliendas, efectuando dos extractos para cada una de las mismas.

II.3.4.2 Cuantificación

El filtrado se analizó en un cromatógrafo HPLC Waters Model 6000A (Milford, MA, USA), acoplado a un detector UV-Visible. Se empleó una columna C₁₈ (5 µm de diámetro de partícula;

4,6 mm de diámetro interno; 25 cm de longitud), usando como fase móvil, KH_2PO_4 0,2 M, llevado a pH 2,2 con ácido ortofosfórico. Se usó un flujo de 0,8 mL/min. La detección de **AsA** se realizó a 254 nm y la de **ADA** a 220 nm.

Se empleó una solución estándar de **AsA** 250 $\mu\text{g/mL}$. El resultado final se expresó como $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco. En el caso del **ADA** se preparó una solución patrón según el método de Kall y Andersen (1999) con ligeras modificaciones. Se obtuvo una solución patrón de **ADA** 4,2 $\mu\text{g/mL}$ preparada de la siguiente manera: a 3 mL de **AsA** (0,14 mg/mL) se adicionó pequeñas cantidades de solución de yodo-yoduro (I_3^-) hasta obtener un color amarillo ligero y constante en el tiempo. Para reducir el exceso de yodo se añadieron 2 cristales de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (o los suficientes para obtener una solución transparente) y se llevó a un volumen final de 10 mL con ácido cítrico 3% *v/v*. El resultado final se expresó como $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco.

II. 3.5. PODER ANTI-RADICAL (PA)

II.3.5.1 Preparación del extracto

Se tomó 1 g de tejido congelado, se trituraron con un molinillo De Longhi Modelo KG39, y homogenizaron en 15 mL de etanol 96% *v/v*. La suspensión obtenida se sometió a agitación durante 60 min, se centrifugó a 9.000 $\times g$ durante 15 min, se separó el sobrenadante por filtración y se completó un volumen total de 30 mL con etanol, se almacenó a -80°C hasta su análisis. La preparación del extracto se llevó a cabo a 4°C . Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado se realizaron dos moliendas y un duplicado de extractos de cada una de ellas.

II.3.5.2 Determinación del PA

El PA del pimiento se determinó por reacción con el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^\cdot) en etanol, según el procedimiento descrito por Brand-Williams y col. (1995) con ligeras modificaciones. Alícuotas de diferentes volúmenes de muestra (volumen final 250 μL) se añadieron a 1 mL de una solución de DPPH^\cdot 40 mg/L en etanol (volumen final de reacción 1250 μL). Se mezcló completamente, y la absorbancia a 515 nm, fue medida después de 10 min empleando un espectrofotómetro UV-Vis, Metrolab 300. Se realizó la cinética de consumo de DPPH^\cdot con diferentes cantidades de extracto para determinar el tiempo de reacción y se halló que a este tiempo (10 min) la reacción alcanzaba un plateau o estado estacionario.

La absorbancia de la solución de DPPH[·] en etanol sin extracto se utilizó como control. Los resultados obtenidos fueron usados para determinar la cantidad (mg) de tejido de pimienta necesaria para secuestrar el 50% de DPPH[·] (EC₅₀). El porcentaje de DPPH remanente fue calculado según la ecuación II-1:

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot} \text{ remanente} = (A_t / A_0) \times 100 \quad (\text{II-1})$$

donde A_t es la absorbancia de la muestra después del tiempo necesario para alcanzar el plateau (10 min) y A₀ es la absorbancia inicial del DPPH[·]. Se evaluaron las absorbancias alcanzadas para cuatro valores de concentraciones diferentes de los extractos etanólicos (EC) y se determinó % de DPPH[·] remanente, para cada una de ellas. Luego se graficó % remanente vs. EC, a partir de allí se interpoló el valor de EC correspondiente al 50% de DPPH[·] remanente (EC₅₀). Los resultados se expresaron como Poder Anti-radical (PA=1/EC₅₀) en 1/mg: a mayor PA, mayor eficiencia como antioxidante. Las medidas se realizaron por triplicado.

II. 3.6. 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 .

II.4. RESULTADOS Y DISCUSION

Para evaluar el efecto de la luz UV-C (10 kJ/m^2) sobre compuestos no enzimáticos con propiedades antioxidantes se cuantificó el contenido de fenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y el poder anti-radical durante el período de almacenamiento a 0°C .

II.4.1 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

Inmediatamente después del tratamiento los frutos tratados mostraron una disminución del contenido de fenoles totales en un 9% respecto a los controles (figura II.7). Estos resultados coinciden con los hallados por Vicente y col., (2005), en pimiento cv Zafiro y sugieren que los tratamientos UV-C podrían generar EROs capaces de oxidar una fracción de los componentes fenólicos. Luego de esta reducción inicial el contenido de fenoles se incrementó en los frutos tratados en forma sostenida. Al final del periodo de almacenamiento los frutos tratados presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos que los controles. De la misma forma, se observó un incremento del contenido de fenoles totales en pimiento (Vicente y col., 2005), y brócoli (Costa y col., 2006) tratados con una dosis de UV-C de 7 y 10 kJ/m^2 respectivamente; al igual que en mangos enteros y mango fresco cortado expuestos a luz UV-C (González-Aguilar y col., 2007a y b).

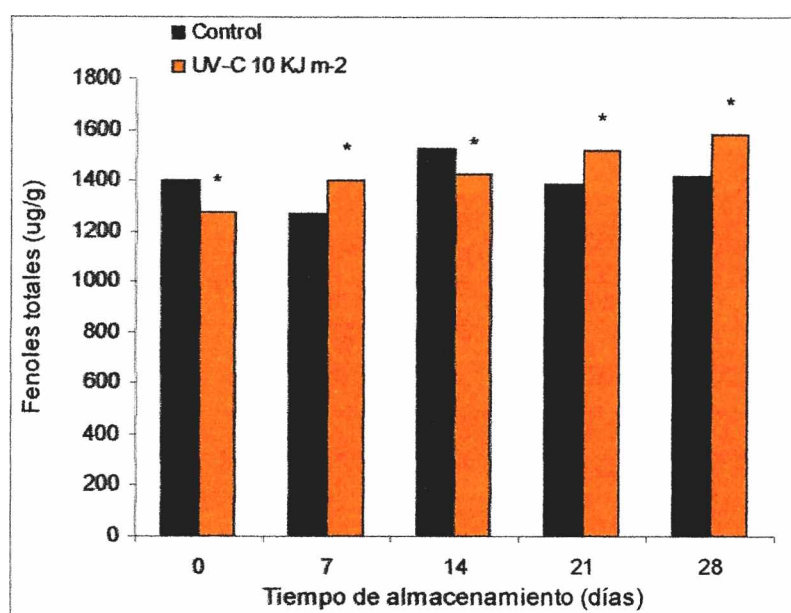


Figura II.7 Contenido de Fenoles totales en pimientos control y tratados ($UV-C 10 \text{ kJ/m}^2$) almacenados a 0°C . Los resultados se expresan como μg de catequina/g tejido. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0.05} = 51.0$

Esto sugiere que la exposición a la radiación UV-C induce la síntesis de compuestos fenilpropanoides. El incremento podría estar asociado con un aumento en la actividad de enzimas regulatorias en la biosíntesis de componentes fenólicos como fenilalanina-amonio liasa (PAL) como se ha observado en otros sistemas. Por ejemplo, Nigro y col. (2000) y González-Aguilar y col. (2007a) mostraron que tratamientos con radiación UV-C incrementaron la actividad de dicha enzima. En ciertas plantas la tolerancia a la radiación UV se asocia con la acumulación de fenoles en las células de la epidermis de las hojas y las que absorben de manera efectiva la radiación UV, previniendo que la misma penetre a la células del mesófilo (Sharma y col., 1998).

Más allá del rol como protector contra el exceso de radiación se conoce que dichos compuestos poseen actividad como inhibidores de patógenos (Ruelas y col., 2006). En ese sentido podría especularse que la acumulación de fenoles en respuesta a los tratamientos podría contribuir a la reducción de enfermedades que se ha descrito en ciertos casos (Vicente y col., 2005; Pan y col., 2004). Por otra parte, la mayor acumulación de fenoles durante el almacenamiento en los frutos tratados implica un mayor 'pool' de componentes con capacidad antioxidante. De todos modos el significado biológico de esto debe considerarse con precaución ya que resultaría de interés conocer la contribución de los componentes fenólicos a la capacidad anti-radical total en pimiento.

II.4.2 CONTENIDO DE FLAVONOIDES

Según los resultados obtenidos, los flavonoides representaron aproximadamente el 10% del contenido de fenoles totales. Inmediatamente después del tratamiento los frutos tratados mostraron una disminución del contenido de flavonoides en un 13% respecto a los controles (figura II.8).

Durante el almacenamiento, en los frutos control el contenido de flavonoides se mantuvo prácticamente constante hasta el día 21. En el día 28 hubo un ligero incremento. En los frutos tratados se observó un aumento en el contenido de flavonoides al día 7, manteniendo prácticamente esos valores en el final del almacenamiento. Los niveles de flavonoides fueron inferiores a esos hallados en los frutos control, con excepción del día 7. Por lo tanto el incremento observado en fenoles totales no parece deberse a un aumento de flavonoides, sugiriendo que la acumulación de fenoles simples probablemente determine el mayor nivel de fenoles totales a tiempos largos de almacenamiento.

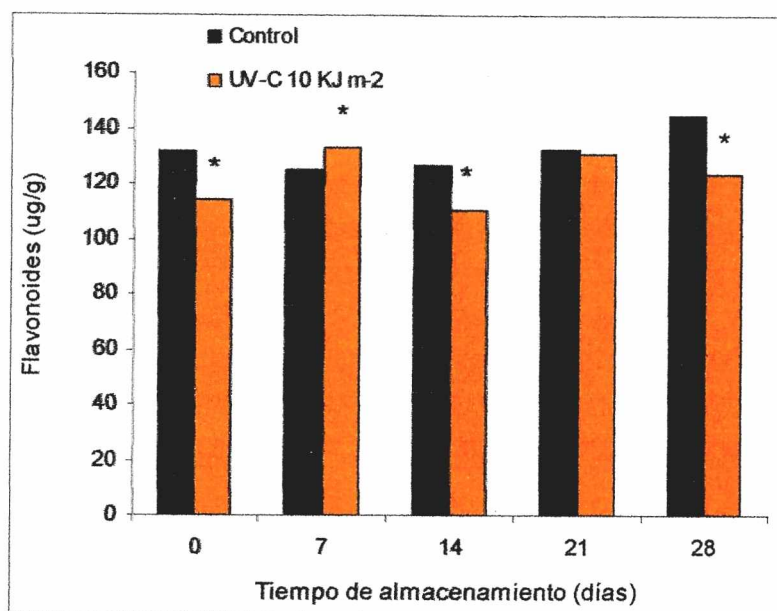


Figura II.8 Contenido de Flavonoides en pimientos control y tratados (UV-C 10 kJ/m²) almacenados a 0°C.. Los resultados se expresan como µg de catequina/g tejido. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 3.8$

Sin embargo, González-Aguilar y col., (2007a y b) observaron, en mangos enteros y frescos cortados tratados con UV-C, que el contenido de flavonoides se vio incrementado durante el almacenamiento a 5°C. Resultados similares se observaron en mandarinas tratadas con rayos X (Rojas-Argudo y col., 2007).

II.4.3 CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO (AsA) Y ACIDO DEHIDROASCORBICO (ADA)

El efecto del tratamiento UV-C sobre el contenido de AsA y ADA en frutos no ha sido extensamente estudiado. En la tabla II.1 y figura II.9, se puede observar que a diferencia de lo ocurrido en el contenido de fenoles totales inmediatamente después del tratamiento no se produjeron diferencias tanto en el contenido de AsA como de ADA entre frutos tratados y controles. Según los resultados obtenidos, el contenido de ADA al momento de cosecha representó aproximadamente un 0,5% respecto al contenido de AsA..

Durante el almacenamiento, el nivel de AsA en los frutos control, aumentó al día 7 respecto al valor inicial (tabla II.1). No obstante, posteriormente se produjo una disminución a lo largo del almacenamiento, alcanzando el día 28, un valor 4% menor respecto al valor inicial. En

los tratados se observó un incremento al día 7 de forma análoga a los controles, luego se produjo una ligera disminución, alcanzando al cabo de 28 días un valor similar al día 0.

Mientras que, el nivel de ADA durante el almacenamiento de frutos control (figura II.9), permaneció prácticamente constante. La radiación UV-C produjo un incremento gradual en el contenido de ADA hasta el día 21 alcanzando un valor 1.3 veces mayor que el inicial, luego disminuyó un 8% al final del almacenamiento (día 28). En kiwi almacenado a 0°C se observó acumulación del contenido de ADA, mientras que el contenido de AsA disminuyó (Agar y col., 1999).

Tabla II.1 Contenido de AsA en frutos control y tratados (UV-C 10 kJ/m²) a lo largo del almacenamiento a 0°C. Los resultados se expresan como µg AsA/ g tejido. LSD_{0,05}= 24.4

Días de Almacenamiento	AsA (µg/g tejido)	
	Control	UV-C 10 kJ/m ²
0	806.3	809.6
7	846.7	846.5
21	763.5	838.0 *
28	778.0	808.0 *

* Indica diferencias significativas entre controles y tratados.

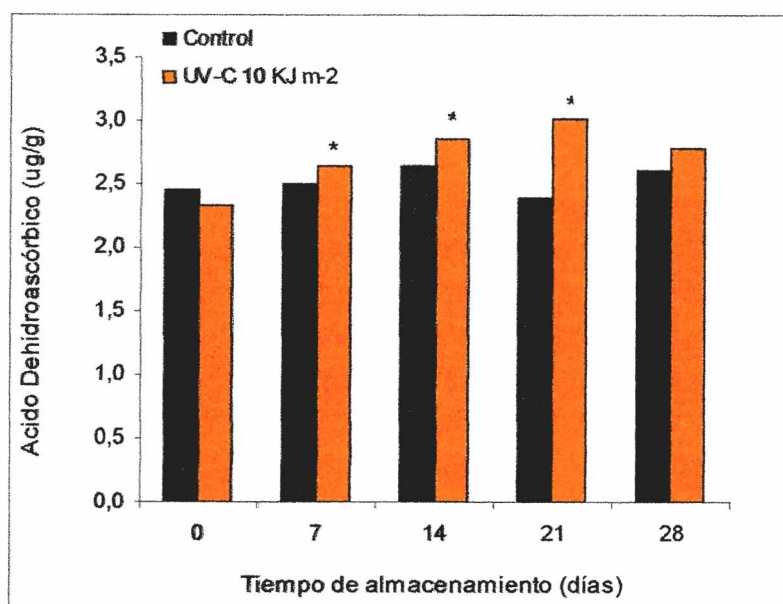


Figura II.9 Contenido de ADA en frutos control y tratados (UV-C 10 kJ/m²) a lo largo del almacenamiento a 0°C. Los resultados se expresan como µg ADA/ g tejido. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una p <0.05. LSD_{0,05}= 0,13

La concentración de AsA en estado estacionario en los frutos puede ser consecuencia del balance entre los procesos de biosíntesis, regeneración y degradación. En términos generales, en pimiento el contenido de AsA aumenta marcadamente durante la evolución de la maduración (USDA, 2007, Jiménez y col., 2003). El hecho de que el contenido de AsA continuó incrementándose aún en frutos almacenados a 0°C por 7 d sugiere que la biosíntesis y/o regeneración prevalecieron en poscosecha, al menos hasta este periodo, respecto a la degradación. El hecho de que el contenido de ADA fue sólo un 0,5% respecto al contenido de AsA también sugiere una mayor biosíntesis de AsA y/o regeneración del mismo. En tal sentido, Jiménez y col. (2003) hallaron que la enzima L-galacto- γ -lactona deshidrogenada (GLDH), involucrada en los pasos finales de la biosíntesis de AsA, se halla activada en pimientos cv California tanto verdes como rojos. Por otro lado, también mostraron que la regeneración de AsA ocurría y el contenido de ADA era bajo, dado que las enzimas monodehidroascorbato reductasa (MDHAR, enzima responsable de convertir MDHA en AsA) y dehidroascorbato reductasa (DHAR, enzima que convierte ADA en AsA) estaban activas.

En nuestro trabajo y durante el almacenamiento, el contenido de AsA mostró una disminución en los frutos control mientras que, en los frutos tratados con UV-C disminuyó más lentamente a valores similares a los iniciales. En el caso de ADA, los frutos tratados presentaron mayores niveles que los controles (figura II.9) aunque este valor fue una muy baja proporción del pool total de ADA+AsA. Bajo condiciones de estrés oxidativo, se ha descrito acumulación de ADA en sistemas biológicos debido a la inhibición de la conversión de ADA en AsA, alterando de esta forma las actividades antioxidantes y enzimáticas dependientes del AsA (Wilson, 2002) pero esta no parece la situación en el caso de los tratamientos realizados en el presente trabajo. La menor disminución de AsA observada en los frutos tratados podría resultar consecuencia de diferentes procesos. En primer lugar una continuación de la biosíntesis de AsA por periodos más prolongados que en los frutos control. En plantines de colza (*Brassica napus*) expuestos a radiación UV-B y C, Nasibi y M-Kalantari (2005) hallaron un incremento de AsA y ADA. Otras alternativas podrían ser o bien una menor oxidación por vía no enzimática o enzimática (por acción de la enzima APX), o bien que aún en condiciones en las que el AsA sea rápidamente oxidado a ADA la regeneración a la forma reducida resulte más eficiente en los frutos tratados con UV-C. Si bien la elucidación de esto requeriría la realización de estudios más detallados, en el presente trabajo se observó que los frutos que sufrieron menor DPF mantuvieron, en etapas intermedias de almacenamiento, niveles más elevados de AsA que los

frutos control. Al igual que se mencionó antes, el significado biológico de esto, debe considerarse con precaución ya que resulta de interés conocer por un lado la contribución de AsA a la capacidad anti-radical total en pimiento y, por otra parte, el rol de un antioxidante dado ante condiciones de estrés podría ser dependiente de su compartimentalización a nivel celular.

II.4.4 PODER ANTI-RADICAL (PA)

La medida del PA presentó una cinética de comportamiento rápido (figura II.10), según lo definido por Brand-Williams y col., (1995), quienes reportan que este comportamiento es común a compuestos como el ácido ascórbico, ácido isoascórbico e isoeugenol, al reaccionar rápidamente con el DPPH·, alcanzando el estado estacionario en menos de un minuto.

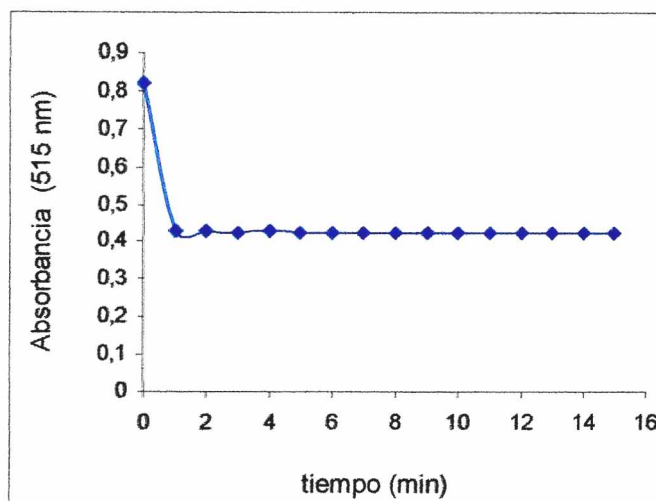


Figura II.10 Disminución del contenido de DPPH· producida por la adición extracto etanólico de pimiento en función del tiempo de reacción.

De esta manera, se puede establecer una relación entre el Asa y PA sugiriendo que uno de los principales componentes responsables del PA en el pimiento es el AsA. Esta relación también fue propuesta por Deepa y col. (2006) trabajando en pimientos rojos.

La Figura II.11 muestra los valores de PA determinados para los frutos control y tratados. Inmediatamente después del tratamiento UV-C no se observó diferencia entre los frutos control y tratados, por el contrario, se observó un incremento en brócoli y mangos frescos cortados tratados con UV-C, según lo reportado por Costa y col., (2006) y González-Aguilar y col., (2007a), respectivamente.

Como se puede apreciar en la figura II.11, en los frutos controles se observó un incremento del PA al día 7, a partir del cual, se mantuvo prácticamente constante hasta el final del almacenamiento. Mientras que los frutos tratados presentaron luego de 7, 14 y 21 d mayor capacidad antioxidante que los controles. González-Aguilar y col. (2007a) también hallaron un efecto positivo en la capacidad antioxidante al tratar mangos frescos cortados con distintas dosis de radiación UV-C, logrando el mayor incremento con el tiempo más alto de exposición (10 min).

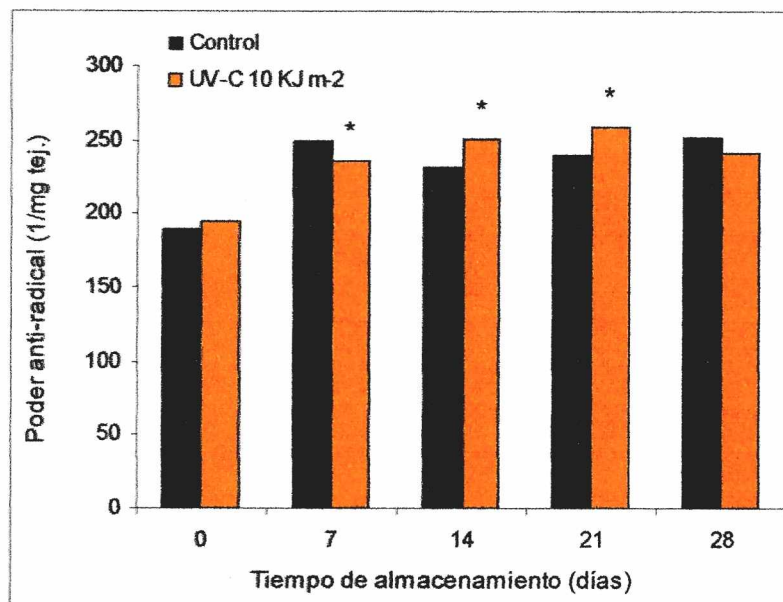


Figura II.11 Poder anti-radical en frutos control y tratados (UV-C 10 kJ/m²) a lo largo del almacenamiento a 0°C. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 13.2$

El análisis global de la actividad antioxidante no enzimática de los pimientos tratados con UV-C parece mostrar 2 tipos de respuestas diferenciadas. En primer lugar y a tiempos cortos no se visualizan modificaciones importantes ni en la capacidad anti-radical ni en el contenido de AsA. De todos modos en esta etapa, la disminución en el contenido de compuestos fenólicos sugeriría que los mismos constituyen una fuente de protección contra la producción exacerbada de EROs ocurrida durante la exposición a la luz UV-C. A tiempos largos de almacenamiento, los frutos tratados mostraron una tendencia a mantener mayor capacidad anti-radical, contenido de AsA y fenoles totales que los controles lo que se asocia con la menor sintomatología de DPF. Es cierto que los resultados hallados aquí no muestran una buena correlación a lo largo del almacenamiento (especialmente a los 7 y 21 días) entre el contenido de AsA y el PA tanto en frutos controles como en tratados. En tal sentido hay discrepancias en la bibliografía. Jiménez y col. (2003) hallaron una buena correlación entre AsA y PA al trabajar con pimientos verdes

almacenados a 20°C, pero no con pimientos rojos como también ocurrió con nuestros resultados. En tal sentido estos autores también hallaron una alta actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) y acumulación de GSH en pimientos rojos, por lo que ellos proponen que GSH podría contribuir también al incremento del PA.

II. 5. CONCLUSIONES

- El contenido de fenoles totales, inmediatamente después del tratamiento UV-C, fue menor que el de los controles. Estos compuestos podrían resultar una fuente de protección contra la producción exacerbada de EROs ocurrida durante los tratamientos. Posteriormente a tiempos largos se observó un incremento en los niveles de fenoles totales en los frutos tratados superando al contenido de los frutos no tratados. Este incremento no parece deberse a un aumento de flavonoides (que representaron sólo un 10% de la fracción fenólica total) sugiriendo que la acumulación de fenoles simples probablemente determine el mayor nivel de compuestos fenólicos totales a tiempos largos de almacenamiento.
- Inmediatamente finalizado el tratamiento con luz UV-C no se observan diferencias en el contenido de AsA o ADA entre frutos control y tratados, a diferencia de lo hallado en los componentes de naturaleza fenólica. La biosíntesis de AsA y ADA continuó en las primeras semanas de almacenamiento refrigerado y posteriormente se mantuvo por encima en los frutos tratados respecto a los control. Si bien resultan necesarios mayores estudios para determinar si estas diferencias entre frutos controles y tratados se asociaron a modificaciones en la tasa de biosíntesis o degradación de AsA, los resultados mostraron que en periodos intermedios de almacenamiento en las cuales comienzan a manifestarse el DPF, el AsA en los frutos tratados se mantuvo en niveles superiores.
- A tiempos largos de almacenamiento los frutos tratados con UV-C mostraron una tendencia a mantener mayor capacidad anti-radical, contenido de AsA y fenoles totales que los controles, lo que se asocia con la menor sintomatología de DPF.
- El AsA fue el componente que contribuyó en mayor proporción a la actividad anti-radical, de acuerdo a lo sugerido por la curva de consumo del radical DPPH'.



CAPITULO III

EFEECTO DEL TRATAMIENTO UV-C SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

III. 1. INTRODUCCION

Aparte de los compuestos antioxidantes detallados en el capítulo anterior, las células tienen una gran número de enzimas que secuestran las EROs ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot}), producidas en condiciones metabólicas normales y ante cualquier tipo de estrés (biótico o abiótico), que pueden afectar el metabolismo normal a través de daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácido nucleicos.

Fung y col. (2004) sugieren la existencia de dos líneas de defensa de la planta frente al estrés oxidativo. La primera línea incluiría a los mecanismos involucrados en la reducción de la producción exacerbada de EROs (*oxidasa alternativa*) y la segunda línea de defensa incluiría al sistema antioxidante asociado a la reducción de EROs una vez producidos (enzimas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasas y las pertenecientes al ciclo ascorbato/glutatió -ascorbato peroxidasa, entre otras-).

El balance entre las actividades de estas enzimas en la célula es crucial para mantener un nivel controlado de producción y eliminación de las EROs (Mittler, 2002).

III.1.1 SUPEROXIDO DISMUTASA

El grupo de enzimas Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) son metaloenzimas y ubicuas, es decir ampliamente distribuidas en los seres vivos.

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ sólo puede atravesar las membranas celulares como HO_2^- o a través de poros. Es posible que, debido a ello, se requiera tener una dismutasa de superóxido (SOD) en cada compartimento celular limitado por una membrana (Alscher y col., 2002). Estas enzimas catalizan la dismutación de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a oxígeno molecular y H_2O_2 , según la ecuación III-1. El H_2O_2 será sustrato para catalasas y peroxidasas.



Las enzimas SOD comprenden tres clases, según el tipo de metal al que están unidas en su sitio activo (Zimmerman y Zentgraf, 2005):

1. **SOD dependiente de Cu^{2+} y Zn^{2+}** , localizadas en el citosol, cloroplastos y mitocondrias. Es un homodímero, se inhibe con cianuro o con un quelante de cobre y es la de mayor actividad en organismos eucariotes.

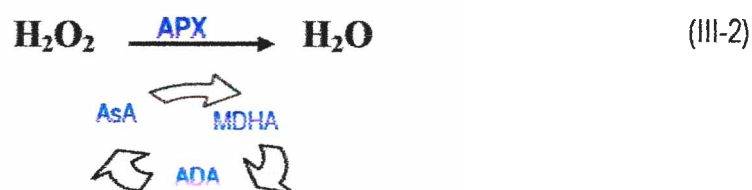
2. **SOD dependiente de Mn²⁺**, ubicada en las mitocondrias. Es un homodimero o tetramero, con un átomo de Mn²⁺ por subunidad, no se inhibe con cianuro, ni tampoco con el H₂O₂. En los eucariotes se encuentra en las mitocondrias, aunque algunos crustáceos sólo tienen esta enzima, tanto en el citosol como en las mitocondrias.
3. **SOD dependiente de Fe³⁺**, se encuentra en procariotes y en cloroplastos de algunas plantas.

Independientemente de la localización celular, las SOD son codificadas en el núcleo celular y luego transportadas a su respectivo compartimento celular.

Alscher y col., (2002), abordan la actividad de SOD dentro de la célula, como la primera línea de defensa contra las EROs. El radical O₂⁻ es producido en cualquier lugar donde una cadena transportadora de electrones esté presente. Por ello, la SOD se encuentra en organelas como cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas (sitios generadores de EROs).

III.1.2 ASCORBATO PEROXIDASA

En las plantas y algas la enzima ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) representa el más importante secuestrador de H₂O₂. La enzima APX cataliza la detoxificación del H₂O₂ oxidando, según la ecuación III-2, el ácido ascórbico (AsA) a monodehidroascórbico (MDHA) que posteriormente se convierte en ácido dehidroascórbico (ADA), todo como parte del ciclo de Halliwell-Asada (sección (II.1.2.3.1)).



La APX tiene alta afinidad por el H₂O₂ y es capaz de detoxificar bajas concentraciones de este compuesto, por ello es considerada como un componente crucial en el metabolismo de defensa contra el estrés oxidativo. Así, la presencia de altas concentraciones de ácido ascórbico en los tejidos vegetales sugiere que está relacionada con los sistemas de defensa que protegen los procesos metabólicos en donde está involucrado el H₂O₂ y otras EROs.

APX son un grupo de enzimas ubicuas en las células vegetales, se localizan en los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y en el citosol, principalmente. Estas enzimas se

caracterizan también por su inestabilidad en ausencia de AsA, cuando éste se encuentra en concentraciones menores a 20 μM , APX pierde actividad rápidamente.

Se han identificado tres distintas isoenzimas de APX: la isoforma citosólica (cAPX) y dos isoformas cloroplásticas; una en el estroma (sAPX), y otra asociada con las membranas de los tilacoides (tAPX) (Schantz y col., 1995).

Diferentes tipos de estrés inducen un incremento en la actividad de APX. En respuesta al ozono o al dióxido de azufre, tratamiento con Fe o Cu, estrés por calor o luz intensa, se produce acumulación de APX citosólica. La APX peroxisomal se acumula en respuesta a varios tipos de estreses abióticos. En contraste con esto, las APX cloroplásticas son débilmente modificadas por estímulos externos (Murgia y col., 2004)

APX actúa en combinación con el ciclo de Halliwell-Asada, explicado con detalle en la sección (II.1.2.3.1), para prevenir la acumulación de niveles tóxicos de H_2O_2 en organismos fotosintéticos.

Shigeoka y col. (2002) reportan un marcado incremento en los niveles de transcripción de cAPX en respuesta a estrés generado por el tratamiento con paraquat y alta luminosidad. En contraste, no se produjo ningún incremento en respuesta a sequía o exceso de sal. En cambio, los niveles de transcripción de APX de mitocondrias y cloroplastos no presentaron ninguna respuesta para ningún tipo de estrés generado. Estos resultados sugieren que las isoformas de APX de cloroplastos y mitocondrias se utilizarían para una eficiente detoxificación de H_2O_2 bajo condiciones normales y de estrés, mientras que la APX del citosol se produce en respuesta a un estrés biótico o abiótico, como protección frente una producción excesiva de H_2O_2 y para un estricto control de la misma en los compartimentos celulares.

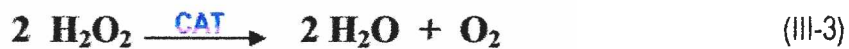
III.1.3 CATALASA

La enzima CATALASA (CAT, EC 1.11.1.6) está ampliamente distribuida en células vegetales y animales. Su rol fisiológico es eliminar el exceso de H_2O_2 producido durante el metabolismo celular evitando de este modo su acumulación y el consiguiente daño celular. Sin embargo, durante el último tiempo han surgido múltiples evidencias que indican que el H_2O_2 es una molécula que actúa como señal química y que es generada por las plantas en respuestas a diferentes tipos de estrés bióticos o abióticos.

A nivel celular, esta enzima se localiza principalmente en peroxisomas aunque algunas veces se ha hallado en mitocondrias (Scandalios y col., 1980). También el H_2O_2 puede difundir hacia los peroxisomas desde otros sitios de producción de EROs.

Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1,1 y 0,09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima.

Ejerce una función catalítica, según la ecuación III-3, donde el donador es otra molécula de H₂O₂. Esta función sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (Céspedes- Miranda y col., 1996). Como CAT no requiere de agentes reductores para su funcionamiento, esta enzima es insensible al estado redox de la célula y su función no es afectada durante el estrés (Mittler, 2002)



Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente menor afinidad por el sustrato que APX, lo que significa que necesita altas concentraciones del sustrato para reaccionar.

Zimmermann y Zentgraf (2005) describen tres isoformas de CAT en células vegetales, presumiblemente con diferentes funciones. Es así que la primer clase depende de alta luminosidad, por ello estaría involucrada en el secuestro de H₂O₂ generado durante el proceso de fotorespiración. Las CAT que componen la segunda clase, presentes en plantas maduras y localizadas principalmente en el tallo y en el mesófilo de las hojas, su expresión no depende de la luz, interviene en la lignificación y en respuesta a estrés pero su función precisa es aún desconocida. El tercer grupo comprende CAT que se hallan principalmente en semillas y plántulas, en algunos casos se presentan en la senescencia y su función es la de remover el H₂O₂ producido durante la degradación de ácidos grasos.

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la enzima CAT como uno de las enzimas antioxidantes que responde a diversos tipos de estrés como: bajas temperaturas, estrés salino, altas concentraciones de oxígeno. También los cambios en la actividad de CAT se han asociado con la senescencia y en hibernación de brotes de plantas (Gong y col., 2000).

III.1.4 PEROXIDASA

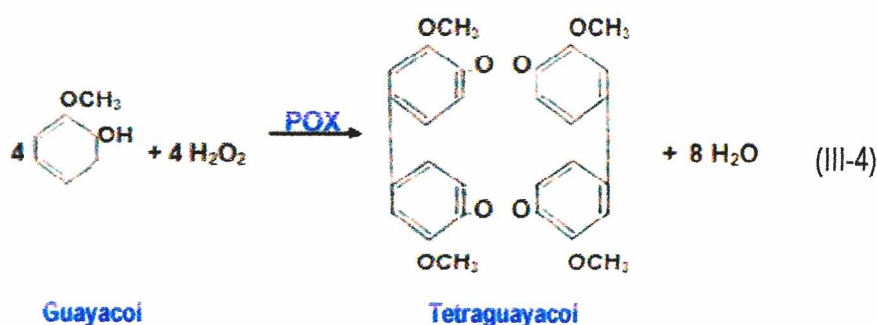
La enzima Peroxidasa (POX; EC: 1.11.1.7), es ubicua en plantas, y cataliza gran diversidad de reacciones, cuando la planta se halla sometida a algún tipo de estrés tanto biótico como abiótico, la actividad de esta enzima se ve modulada (Jang y col., 2004).

Thongsook y Barret (2005) reportan que en la célula, la enzima POX se puede hallar de dos formas, una soluble (libre o no ligada) y una ligada a membranas, se encuentra en vacuolas, tonoplasto, plasmalema y en la pared celular (interna y externamente) cumpliendo una amplia variedad de funciones.

La POX es una hemoproteína, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los cianuros y la hidroxilamina, inhibiendo su actividad enzimática.

Es una oxidoreductasa que cataliza la reacción en la que H_2O_2 actúa como aceptor y otro compuesto actúa como donador de átomos de hidrógeno.

La enzima tiene alta especificidad con el peróxido como sustrato, pero tiene baja especificidad hacia el sustrato donador de hidrógeno que pueden ser fenoles (guayacol, pirogalol) o aminas aromáticas. Por esta razón, para su determinación, el sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol representado en la ecuación III-4.



Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisan mayor temperatura y tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la *regeneración enzimática* (Thongsook y Barret, 2005). Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidroxílicos o sulfhidrílicos.

En los tejidos vegetales, la enzima POX está involucrada en una diversidad de procesos como el pardeamiento enzimático, utilizando compuestos fenólicos como sustrato (Chisari, 2007) entre otros el guayacol, pirogalol, ácido clorogénico. La oxidación de un amplio rango de compuestos orgánicos sugiere que la enzima puede estar asociada a la pérdida de color, aroma y valor nutricional de productos frescos y procesados (Thongsook y Barrett, 2005).

La inactivación de esta enzima por el calor es una característica que se utiliza como una forma de control cuando se aplican tratamientos térmicos en el procesado de ciertos alimentos para asegurar que luego de aplicado correctamente el tratamiento no se produzcan pérdidas de calidad asociados a la acción de esta enzima sobre sustratos presentes en el alimento.

Pomar y col., (1997) realizaron la purificación y caracterización de la POX en frutos de pimiento, sin embargo el rol preciso de cada isoforma no está completamente dilucidado debido a la falta de información sobre la localización de las enzimas y la disponibilidad de sustratos específicos *in vivo*. Los dos principales grupos de peroxidasas encontrados en *Capsicum*, se diferencian por sus puntos isoeléctricos: a) "peroxidasa ácida" (aPOX), de punto isoeléctrico ácido (pH 3,5) y están ligadas a la pared celular y libres en el apoplasto; b) "peroxidasa básica" (bPOX), de punto isoeléctrico básico (pH 9,5) y algunas de ellas están localizadas en la pared celular y otras también en vacuolas.

Díaz y col., (2004) en investigaciones realizadas en frutos de pimiento proponen que el factor que determinaría que las isoenzimas se encuentren de forma ligada o no ligada a las paredes celulares, aparentemente estaría dado por la relación Ca^{2+}/H^{+} de la pared celular. También se ha investigado la relación de POX con el metabolismo y degradación de capsaicinoides, con estos procesos se relaciona directamente a la bPOX, ya que la capsaicina y dehidrocapsaicina y sus precursores fenólicos son fácilmente oxidados por esta isoforma, no obstante, la participación de la aPOX sobre el metabolismo de los capsaicinoides es aún desconocida (Pomar y col., 1997).

III.1.5 COOPERACION ENTRE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Las enzimas antioxidantes presentes en los sistemas biológicos no funcionan por separado, dependen una de otra. Según el compartimento en el que se localicen ejercen una función específica que será complementada por otra en el mismo o en un compartimento distinto, de manera que, conjuntamente mantienen la homeostasis del sistema.

Se puede, realizar una comparación de la función desempeñada por las enzimas CAT y POX. Como se explicó en la sección III.1.4, la enzima POX realiza una actividad "peroxidativa",

pudiéndose comparar con el rol que desempeña la enzima CAT, que podría ser llamada POX-específica que protege a la célula de los efectos tóxicos del H₂O₂. Es de resaltar que POX está presente en vacuola, pared celular y citosol, pero no en organelas. Por lo tanto, el hecho de que APX si esté en organelas (estroma, membrana tilacoidal en cloroplasto, membrana de peroxisoma y glioxisoma, y citosol) y funcione muy bien como parte del ciclo de Halliwell-Asada permite una detoxificación de H₂O₂ más general en la célula (Shigeoka y col., 2002).

Zimmermann y Zentgraf (2005) sugieren que hay diferencia de afinidad de APX y CAT por el H₂O₂; APX podría ser responsable de una regulación fina o de bajas concentraciones de EROs, mientras que CAT, sería responsable de remover el exceso de H₂O₂ principalmente en situaciones de mayor acumulación de esta especie.

Se observa que la actividad de APX generalmente se incrementa cuando la actividad de enzimas como CAT, SOD, GR también aumenta, lo que sugiere que los componentes enzimáticos del sistema secuestrador de EROs se hallan co-regulados.

Los estudios realizados hasta el momento, muestran que el ciclo de Halliwell-Asada estaría presente en la mayoría de los compartimentos celulares, sumado a la alta afinidad de APX por el H₂O₂, significaría que este ciclo juega un rol muy importante en el control de los niveles de EROs en esos compartimentos. En contraste, CAT está principalmente presente en los peroxisomas, no obstante es una enzima indispensable para la detoxificación de EROs durante situaciones de estrés, cuando los niveles de EROs aumentan. Adicionalmente se sabe que durante el estrés oxidativo se produce una proliferación de peroxisomas (Mittler, 2002).

En la figura III-1 se puede observar la formación de EROs y la cooperación de las enzimas antioxidantes que se produce en la célula.

La diferencia entre un fruto tolerante y uno sensible a bajas temperaturas que puedan inducir estrés oxidativo, radicaría en la capacidad de control de la producción y eliminación de EROs.

Así, un incremento en el nivel de actividad de las enzimas antioxidantes en frutos y hortalizas, ayudaría a conservar la integridad celular por el secuestro de EROs y podría tender a reforzar la vida poscosecha y preservar la calidad nutricional y de alguna manera, la calidad comercial del producto.

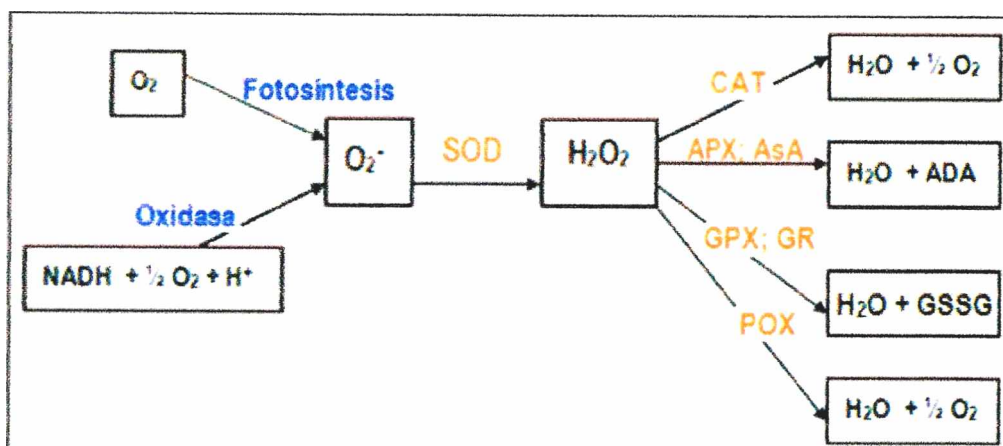


Figura III-1. Formación de EROs y cooperación de enzimas antioxidantes (Mittler, 2002).

Abreviaturas: SOD, Superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, Ascorbato peroxidasa, AsA, ácido ascórbico; ADA, ácido dehidroascórbico; GPX, Glutatión peroxidasa; GSSG, Glutatión oxidado; POX, peroxidasa.

III.1.6 COOPERACION ENTRE LOS DIFERENTES SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Para que un sistema sea capaz de superar una condición de estrés, requiere de un trabajo conjunto del sistema antioxidante enzimático y no enzimático.

En la figura III-2 se describe esquemáticamente la distribución del sistema celular de producción y eliminación de EROs en los diferentes compartimentos celulares (cloroplasto, mitocondria, microsoma, citosol y apoplasto) y de qué forma se interrelacionan las enzimas y compuestos antioxidantes. Allí se muestra que, en organismos fotosintéticos, la enzima APX disminuye los niveles de H_2O_2 en diversos sectores de la célula, a expensa de consumir AsA, pero éste último se regenera a través del ciclo de Halliwell-Asada de manera muy eficiente. En el cloroplasto de plantas superiores, en forma conjunta al ciclo de Halliwell-Asada localizado en el estroma, el ciclo agua-agua (encargado de la fotoreducción del oxígeno a agua en el sistema fotosintético I por los electrones que derivan del agua del sistema fotosintético II), participan en la detoxificación de EROs y en la disipación de energía de los fotones (Asada, 1992).

Takahama y Oniki (1997), investigaron la relación entre los compuestos fenólicos con el AsA y la función de la enzima POX sobre el H_2O_2 donde, este compuesto difunde en las vacuolas y puede ser reducido por la POX utilizando a compuestos fenólicos como un donador primario de electrones. Tanto el AsA como el ADA pueden reducir radicales fenoxilos generados por esta oxidación. La regeneración del AsA se produce en el citosol, entonces el AsA es transportado nuevamente a la vacuola. Por lo tanto, un sistema POX/fenoles/AsA funcionaría como secuestrador de H_2O_2 en esta organela y contribuiría a la resistencia al estrés oxidativo.

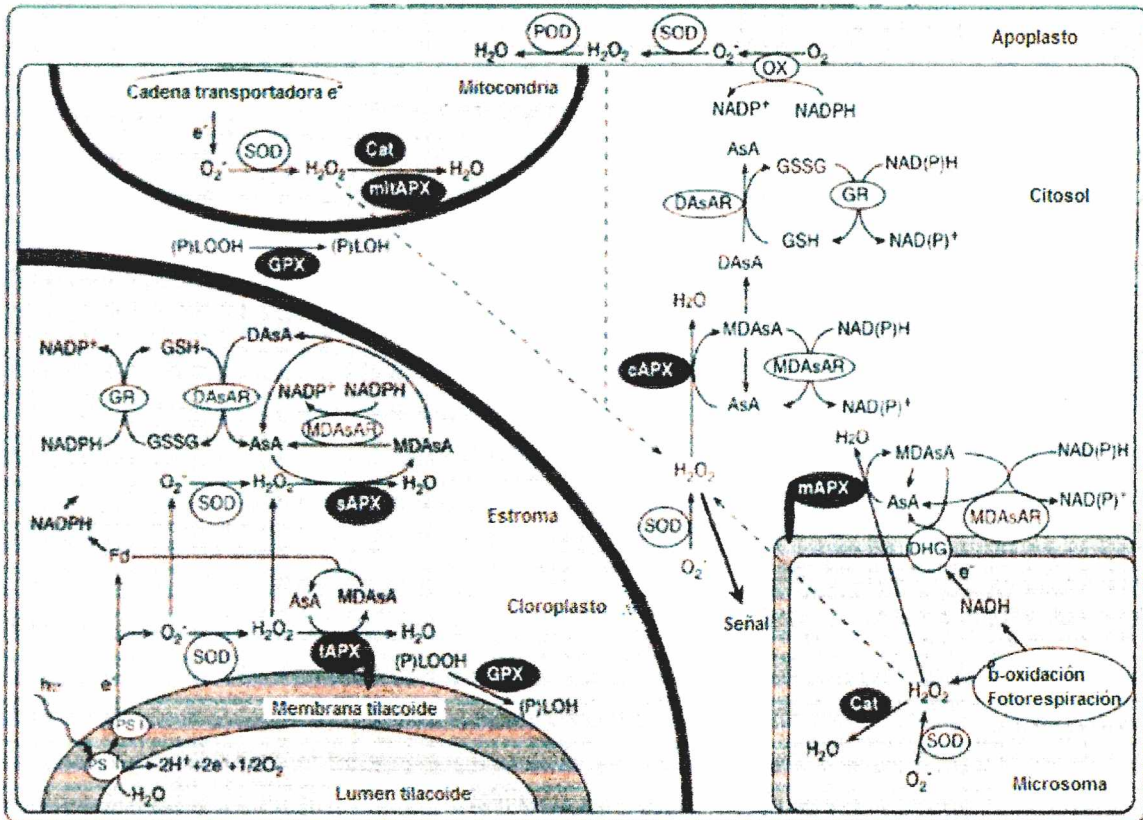


Figura III-2. Sistema de producción/eliminación de EROs en plantas superiores (Shigeoka y col., 2002)

El estudio de las EROs y los antioxidantes ha cobrado un gran interés en los últimos años. Una investigación en aspectos nutricionales y tecnológicos ha puesto de manifiesto la importancia del requerimiento del empleo de antioxidantes en la dieta. De ahí la importancia de la aplicación de tecnologías que permitan que los productos frescos mantengan su calidad conservando sus atributos nutricionales hasta ser consumidos.

III. 2. OBJETIVO

Estudiar el efecto del tratamiento con radiación UV-C (10 kJ/m²) sobre las actividades de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa y peroxidasa durante el almacenamiento de pimientos a 0°C.

III. 3. MATERIALES Y METODOS

III.3.1. MATERIAL VEGETAL

Las experiencias se llevaron a cabo empleando pimientos (*Capsicum annum* L., Blocky cv Cornago), que se cultivaron, cosecharon y acondicionaron tal como se describe en la sección I.3.1.

III.3.2. TRATAMIENTO CON LUZ UV-C

Los frutos fueron irradiados aplicando una dosis de 10 kJ/m² y almacenados, según se describiera en la sección I.3.2. A los días 0, 7 y 14 los frutos fueron retirados de la cámara de almacenamiento. Luego de ser evaluados visualmente se retiraron las semillas, se cortaron y congelaron en N₂ líquido para finalmente conservarlos a -20°C hasta su posterior análisis.

III.3.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

III.3.3.1. SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

III.3.3.1.1. Extracción y medida de la actividad enzimática

Aproximadamente 2 g de tejido congelado fueron triturados con un molinillo De Longhi Modelo KG39, en 15 mL de buffer de extracción (Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ 100mM pH 7,8) conteniendo PMSF 1mM, EDTA 0,1mM, PVPP 10 g/L. La suspensión resultante se sometió a agitación por 60 min y luego se centrifugó a 13000 x g durante 35 min. Se separó el sobrenadante, se distribuyó en alícuotas y finalmente se almacenaron a -80°C hasta ser analizadas. La preparación del extracto se llevó a cabo a 4°C. Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado, y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

La actividad de SOD fue determinada según Giannopolitis y Ries (1977), con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 100 mM de buffer Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ 100mM, pH 7.8, metionina 13 mM, nitroblue tetrazolium (NBT) 75 µM, riboflavina 6 µM, EDTA 0,1 mM y 200 µL de extracto enzimático, en un volumen total de 3.0 mL. La mezcla de reacción fue preparada en tubos transparentes y uniformes, una vez homogenizados se colocaron a 30 cm bajo 4 lámparas fluorescentes de 30 W a temperatura ambiente por 15 min. La reacción empieza/termina con el encendido/apagado de las lámparas, respectivamente. Una mezcla de reacción irradiada, sin extracto enzimático se utilizó como *control*. Una mezcla completa de

reacción no irradiada fue usada como *blanco*. Finalmente, la absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 560 nm en un espectrofotómetro Beckman Du650. Una unidad de actividad de SOD se definió como la cantidad de enzima que, bajo las condiciones de ensayo, causa un 10% de inhibición de la reacción (o absorbancia) observada en ausencia de enzima.

III.3.3.1.2. Optimización de las condiciones de reacción

Optimización de la concentración de Riboflavina: se midió la absorbancia a 560 nm de una mezcla de reacción sin extracto enzimático, como se indicó en (III.3.3.1.1), con concentraciones de riboflavina comprendidas entre 2 y 10 μM . Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Optimización del tiempo de reacción: la actividad de SOD se ensayó a 560 nm, como se indicó en (III.3.3.1.1) con diferentes tiempos de exposición a la luz fluorescente (de 3 a 21 min, con intervalos de 3 min). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Optimización de la intensidad lumínica: la actividad de SOD se ensayó a 560 nm, como se indicó en (III.3.3.1.1) utilizando 30, 60, 90 y 120 W. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Optimización de la concentración de enzima: para determinar la cantidad de extracto a emplear, se determinó la actividad SOD como se indicó en (III.3.3.1.1), y se estudió el efecto del porcentaje de extracto enzimático entre 3 y 33 % v/v con respecto al volumen final de mezcla de reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

pH y temperatura: todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y pH 7,0 (Koca y col, 2006; Martínez-Solano y col, 2005; Murage y Masuda, 1997).

III.3.3.2. ASCORBATO PEROXIDASA (APX)

III.3.3.2.1. Extracción y medida de la actividad enzimática

El material vegetal (2 g aproximadamente) se homogeneizó con 15 mL de buffer de extracción (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 100mM pH 7) conteniendo PMSF 1mM, EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1% v/v y PVPP 10 g/L y ácido ascórbico 5 mM. La suspensión resultante se sometió a agitación por 60 min y se centrifugó a 13000 xg durante 35 min. Se separó el sobrenadante, se distribuyó en alícuotas que finalmente se almacenaron a -80°C hasta ser analizadas. La preparación del extracto se llevó a cabo a 4°C . Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

La actividad de la enzima APX fue determinada según Nakano y Asada (1987). La mezcla de reacción contenía buffer fosfato (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 100mM pH 7), EDTA 0,1 mM, ascorbato de sodio 0,5 mM, H_2O_2 0,1 mM y 300 μL de extracto enzimático. La actividad de APX se determinó monitoreando la oxidación del ascorbato y el cambio de absorbancia a 290 nm durante 2 min en un espectrofotómetro Beckman Du650. Se realizaron dos controles de reacción: sin extracto (para considerar la posibilidad de oxidación química debida a otros componentes de la mezcla de reacción) y sin H_2O_2 (para considerar la oxidación del ascorbato dependiente del extracto). La actividad de APX se corrigió por la substracción de la oxidación del ácido ascórbico dependiente del H_2O_2 . Una unidad de actividad de APX fue definida como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ascorbato de sodio por min.

III.3.3.2.2. Optimización de las condiciones de reacción

Optimización de la concentración de ascorbato de sodio: la actividad de APX se ensayó a 490 nm, como se indicó en (III.3.3.2.1), pero variando la concentración de ascorbato de sodio en un rango de 0,05 a 0,4 mM.

Optimización de la concentración de H_2O_2 : la actividad de APX se ensayó a 490 nm, como se indicó en (III.3.3.2.1), pero variando la concentración de H_2O_2 en un rango de 0,13 a 5,4 mM.

Control de la Oxidación del ascorbato de sodio: se ensayó la posibilidad de oxidación no enzimática del ascorbato, y la oxidación dependiente de peróxido (Mercado y col., 2003), con una mezcla de reacción en ausencia de extracto enzimático y en ausencia de H_2O_2 , respectivamente.

Optimización de la concentración de enzima: para determinar la cantidad de extracto a emplear, se determinó la actividad APX como se indicó en (III.3.3.2.1), y se estudió el efecto del porcentaje de extracto enzimático entre 1,6 y 16,6 % v/v con respecto al volumen final de mezcla de reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

pH y temperatura: todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y pH 7.0, parámetros citados en numerosos ensayos (Anza y col, 2005; Tsuyoshi y col, 2006).

III.3.3.3. CATALASA (CAT)

III.3.3.3.1. Extracción y medida de la actividad enzimática

Se tomaron 2 gr de tejido congelado en N_2 líquido se pulverizaron en un molinillo (Modelo De Longhi Modelo KG39), se adicionaron 15 mL de buffer fosfato (KH_2PO_4 0.1M, Na_2HPO_4

0.1M, pH 7,0) conteniendo PMSF 1mM, EDTA 0,1mM, Tritón X-100 0,1 % v/v y PVPP 10 g/L. La suspensión resultante se sometió a agitación por 60 min y se centrifugó a 13.000 x g durante 35 min. Se separó el sobrenadante, se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta ser analizadas. La preparación del extracto se llevó a cabo a 4°C.

Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

La actividad de CAT se determinó según el método de Du y Bramlage (1995) con ligeras modificaciones, cuantificando la concentración de H₂O₂ remanente, a través de la reacción con TiCl₄, formando un compuesto estable, de color amarillo. La mezcla de reacción contenía 500 µL de buffer (KH₂PO₄ 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1M, pH 7,0), 250 µL de H₂O₂ 60 mM, y 250 µL de extracto enzimático. Alícuotas de 150 µL se tomaron a los 0, 0,5, 1, 2, 3 y 5 min y la reacción se detuvo por adición de éstas a una solución formada por 300 µL de tetracloruro de titanio (TiCl₄) 0,2M 200 µL de H₂SO₄ concentrado y 1.350 µL de H₂O, para completar un volumen final de reacción de 2.500 µL. La absorbancia de las muestras se midió a 410 nm y la concentración de H₂O₂ fue calculada usando una curva de calibración de 2 a 16 mM. Una unidad de CAT se definió como 1 µmol de H₂O₂ consumido por min.

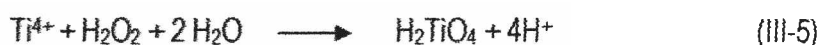
III.3.3.3.2. Optimización de las condiciones de reacción

Optimización de la concentración de sustrato: la actividad de CAT se ensayó a 410 nm, como se indicó en (III.3.3.3.1), pero variando la cantidad de H₂O₂ en un rango de 6 a 20 mM.

Optimización de la concentración de enzima: para determinar la cantidad de extracto a emplear, se determinó la actividad CAT como se indicó en (III.3.3.3.1), y se estudió el efecto del porcentaje de extracto enzimático entre 7,5 y 50% v/v con respecto al volumen final de mezcla de reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

pH y temperatura: todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y pH 7.0, parámetros citados en numerosos ensayos (Niknam y col, 2006; Anza y col, 2005; Rani y col, 2004).

Curva de calibración (H₂O₂): para comprobar que el extracto enzimático no produce interferencia con la formación del compuesto entre el catión titanio y H₂O₂, se realizó una curva estándar de concentración conocida de H₂O₂ (de 2 a 16 mM), elaborada con H₂O₂, solución de cloruro de Titanio y extracto enzimático inactivo (hervido 15 min aproximadamente). La reacción entre el catión titanio y H₂O₂ se describe en la ecuación III-5.



Optimización de la reacción entre el catión titanio y H₂O₂: se ensayó la estabilidad de la reacción entre titanio y H₂O₂, en el tiempo, con una mezcla de buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; 180 µL de H₂O₂ 6 mM, 600 µL de TiCl₄ 0,2 M , 400 µL de H₂SO₄ concentrado y H₂O, para completar un volumen final de reacción de 4 mL, se midió la absorbancia a intervalos de 5 min durante media hora, a 80 y 130 min.

III.3.3.4. PEROXIDASA (POX)

III.3.3.4.1. Extracción y medida de la actividad enzimática

Se efectuó un extracto a partir de tejido de fruto congelado, como se indicó en (III.3.3.3.1).

La actividad POX fue estimada por la medida del incremento de la absorbancia por la formación del producto de dehidrogenación del guayacol a 470 nm en un espectrofotómetro Beckman Du650, durante 120 s, según el método de Flurkey y Je, (1978) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 1040 µL de buffer (KH₂PO₄ 0.1M, Na₂HPO₄ 0.1M, pH 7,0), 300 µL de extracto enzimático, 500 µL guayacol 0,25 % v/v, 160 µL de H₂O₂ 100 mM, para un volumen final de 2 mL. Una unidad de actividad de POX fue definida como el cambio de absorbancia por min (Δ OD/min).

III.3.3.4.2. Optimización de las condiciones de reacción

Optimización de la concentración de H₂O₂: la actividad de POX se ensayó a 470 nm, como se indicó en ((III.3.3.4.1), pero variando la concentración de H₂O₂ en un rango de 2-20 mM.

Optimización de la concentración de sustrato (guayacol): la actividad de POX se ensayó a 470 nm, como se indicó en (III.3.3.4.1), pero variando la concentración de guayacol en un rango de 0,1 a 1% v/v en solución acuosa.

Concentración de la enzima: todas las determinaciones se realizaron utilizando 300 µL de extracto enzimático, valor descrito en numerosos ensayos (Vicente y col., 2006).

pH y temperatura: todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y pH 7,0; parámetros citados en numerosos ensayos (Scebba y col, 2006; Yue-Xuan y col., 2002).

III.3.4. CONTENIDO DE PROTEINA

El contenido de proteína soluble de cada extracto fue determinado según el método de Bradford (1976). La mezcla de reacción contenía 50 µL de extracto enzimático, 1000 µL de reactivo de Bradford y agua bi-destilada hasta completar un volumen final de reacción de 1500 µL.

La absorbancia de las muestras se midió a 595 nm y la concentración de proteína fue calculada usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar proteico, con una curva de calibración de 0 a 10 µg/mL. Los resultados se expresaron como mg proteína/g de tejido fresco.

III.3.5. 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.

III. 4. RESULTADOS Y DISCUSION

Se evaluó el sistema enzimático con propiedades antioxidantes (SOD, APX, CAT y POX), el cual es capaz de actuar en diferentes compartimentos celulares como un mecanismo de defensa frente a las EROs formadas por el tratamiento con UV-C (10 kJ/m²) y/o por mecanismos fisiológicos que ocurren durante el período de almacenamiento refrigerado (0°C).

Los análisis se realizaron hasta el día 14 de almacenamiento debido a que durante este período comenzó el desarrollo de los síntomas de DPF.

III.4.1. SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

III.4.1.1. Optimización de las condiciones de reacción

Optimización de la concentración de riboflavina: con el fin de determinar una absorbancia dentro del rango de medida para visualizar la reacción de SOD, se evaluaron distintas concentraciones de riboflavina en el volumen final de reacción sin extracto enzimático (tabla III.1), de las cuales se decidió trabajar con una concentración 6 µM porque la mezcla de reacción mostró una absorbancia alta, a partir de la cual se observaría la inhibición de la reacción en presencia de extracto enzimático, consecuentemente esta concentración se seleccionó para ensayos futuros.

Tabla III.1. Valores de absorbancia según las distintas concentraciones de riboflavina en la mezcla de reacción en ausencia de extracto.

Riboflavina (µM)	Absorbancia (560 nm)
0	0,8754
2	0,4458
4	0,5440
6	0,8864
8	1,0694

Optimización del tiempo de reacción: se determinó el tiempo de desarrollo del complejo coloreado, como se describe en la sección III.3.3.1.1 con una mezcla de reacción sin extracto enzimático. Se observó una relación directa entre el valor de absorbancia (560 nm) del complejo coloreado con el tiempo de exposición a la luz fluorescente. Se ensayaron varios minutos de exposición a la luz (Tabla III.2) y se determinó que con 15 min de exposición, la mezcla de reacción mostraba un valor máximo aceptable, a partir del cual se observaría la

inhibición de la reacción en presencia de enzima, en consecuencia, este tiempo se seleccionó para futuros ensayos.

Tabla III.2. Valores de absorbancia según el tiempo de exposición a la luz fluorescente en la mezcla de reacción en ausencia de extracto.

Exposición a luz fluorescente (min)	Absorbancia (560 nm)
3	0,3279
5	0,5688
9	0,7651
15	0,8030
17	0,9788
18	0,9920

Optimización de la intensidad lumínica: se determinó el grado de desarrollo del complejo coloreado en función de la intensidad lumínica empleada con una mezcla de reacción sin extracto enzimático (como se describe en la sección III.3.3.1.1). Se observó una relación directa entre el valor de absorbancia (560 nm) del complejo coloreado con la intensidad de luz empleada (tabla III.3). Con la exposición a 30, 60, 90 y 120 W, las mezclas de reacción presentaron valores de absorbancia crecientes. Se eligió la intensidad de 120 W, que mostró un valor máximo aceptable, a partir del cual se observaría la inhibición de la reacción en presencia de enzima.

Tabla III.3. Valores de absorbancia según las distintas intensidades lumínicas empleadas.

Intensidad lumínica (W)	Absorbancia (560 nm)
30	0,3891
60	0,4687
90	0,6543
120	0,8904

Optimización de la concentración de enzima: se determinó la actividad de SOD como se indicó en la sección III.3.3.1.1 en función del porcentaje de extracto agregado. Cuando se empleó un 6% v/v de extracto, se observó aproximadamente un 50 % de inhibición de la reacción (tabla III.4) respecto a lo observado en ausencia de extracto. Por otra parte hasta este valor se observó linealidad entre la cantidad de enzima y la actividad medida. Esta concentración sería la elegida para utilizar en futuras determinaciones de la actividad de SOD.

Tabla III.4. Valores de absorbancia según las distintas concentraciones de extracto enzimático

Extracto enzimático (% v/v)	Absorbancia (560 nm)
0	0,8727
3	0,6820
6	0,4631
16	0,2338
26	0,2016
33	0,1977

III.4.1.2. Cambios de la actividad SOD durante el almacenamiento.

Como se observa en la figura III.3, en el día inicial, los frutos tratados presentaron una actividad SOD comparable a la de los controles. En los frutos control la actividad SOD mostró una tendencia a disminuir hacia el día 14. Los frutos tratados mostraron un incremento en la actividad SOD al día 7, presentando una actividad 25 % superior a la de los frutos control. Luego la actividad SOD disminuyó alcanzando un valor similar al control al final del almacenamiento. Esto difiere de lo hallado por Barka (2001), quien observó en tomate que inmediatamente después del tratamiento y a lo largo del almacenamiento los frutos tratados tuvieron menor actividad de SOD que los controles.

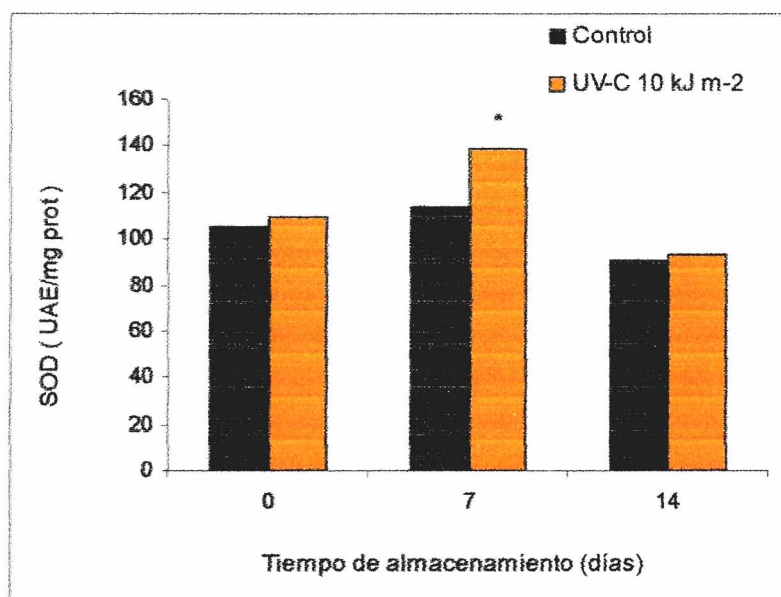


Figura III.3. Evolución de la actividad específica de SOD de frutos control y tratados con UV-C (dosis 10Kj/m²) en función del tiempo de almacenamiento a 0°C. El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 15,34$. $UAE_{SOD} = 10\%$ de inhibición de la reacción.

La actividad de SOD observada inmediatamente después del tratamiento sugeriría que la radiación UV-C no produciría un incremento del ión superóxido (O_2^-) capaz de activar esta enzima. Luego de 7 d de almacenamiento, período en el cual comienza a hacerse incipiente el desarrollo de DPF, la dismutación del ión O_2^- se hace más evidente sólo en los frutos tratados, dado que en los frutos control la actividad SOD no varía respecto a la de los frutos recién cosechados. En línea con esto, resulta interesante destacar que una de las alteraciones que se ha descrito durante el desarrollo de DPF en pimientos es un incremento en la producción de superóxido a nivel mitocondrial (Purvis., 2001), lo cual sugeriría que en los frutos control podría existir una acumulación de O_2^- .

III.4.2. ASCORBATO PEROXIDASA (APX)

III.4.2.1. Optimización de las condiciones de reacción

Efecto de la concentración de ascorbato de sodio: se evaluó el efecto de concentraciones de ascorbato entre 0,05 y 0,3 mM, sobre la actividad de APX. Como se observa en la figura III.4 a partir de 0,25 mM de ascorbato se alcanza un valor máximo en la velocidad de reacción (variación de absorbancia en el tiempo), por lo que, se consideró que esta concentración sería apropiada para utilizar en futuras determinaciones de la actividad de APX.

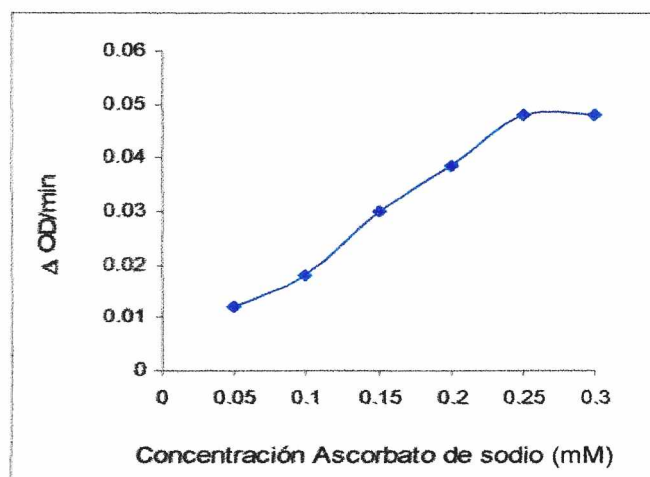


Figura III.4 Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de APX en función de las distintas concentraciones de ascorbato de sodio.

Efecto de la concentración de H_2O_2 : se evaluó el efecto de concentraciones de H_2O_2 entre 0,13 y 5,4 mM sobre la actividad de APX. Como se observa en la figura III.5 se alcanzó un

niveles de velocidad máxima a partir de 1,1 mM de ascorbato. Por esta razón una concentración de 2,7 mM de H₂O₂ fue elegida para utilizar en futuras determinaciones de la actividad de APX.

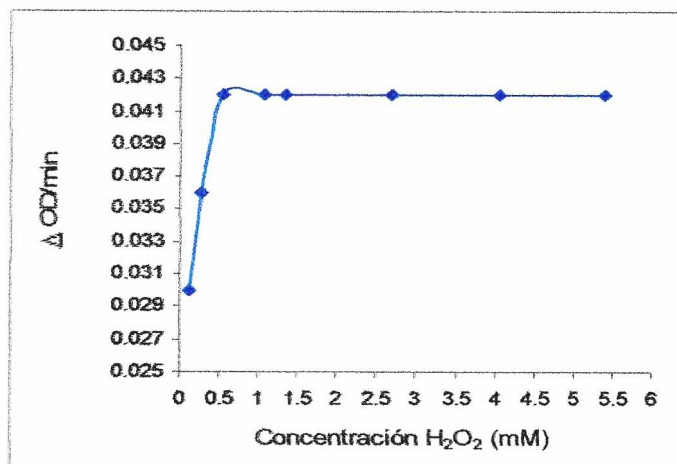


Figura III.5. Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de APX en función de las distintas concentraciones de H₂O₂

Control de la oxidación del ascorbato de sodio:

El análisis de la actividad enzimática de APX se basa en la determinación de la oxidación del ascorbato utilizando H₂O₂. El ascorbato puede ser oxidado por medio de enzimas como la APX ("Oxidación enzimática" – figura III.6) o por compuestos no enzimáticos como los radicales tocoferoxilo.

- *Oxidación del ascorbato de sodio por el extracto:* para determinar la oxidación del ascorbato específicamente por los componentes del extracto, se omitió el H₂O₂ de la mezcla de reacción y se observó que la actividad de APX fue esencialmente constante en el tiempo (figura III.6), es decir que el extracto enzimático no oxida al ascorbato en ausencia de H₂O₂. Se la llamará "Oxidación por extracto".
- *Oxidación del ascorbato de sodio por H₂O₂:* para determinar la oxidación del ascorbato específicamente por H₂O₂, se omitió el extracto enzimático de la mezcla de reacción y se observó disminución en los valores de absorbancia durante el tiempo de reacción, es decir que el H₂O₂ oxidaría una parte del ascorbato (figura III.6), a la que se llamará "Oxidación química". Por esta razón sería necesaria la corrección de la actividad de APX.

Entonces, para la determinación de la actividad de APX, es decir la oxidación enzimática del ascorbato, fue necesaria la sustracción del valor correspondiente a la oxidación química.

Con ello nos aseguramos que el valor obtenido correspondiera a la oxidación del ascorbato específicamente por APX utilizando H_2O_2 .

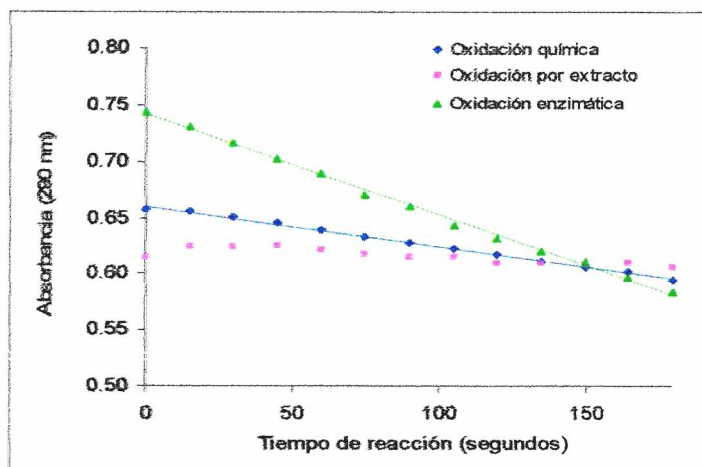


Figura III.6. Medida de la oxidación del ascorbato de sodio a 290nm en función del tiempo. Oxidación química: mezcla de reacción sin agregado de extracto enzimático; Oxidación por extracto: mezcla de reacción sin agregado de H_2O_2 ; Oxidación enzimática+ química: mezcla de reacción completa.

Efecto de la concentración de enzima: la actividad de APX en función del porcentaje de extracto se evaluó como el cambio de absorbancia en el tiempo ($\Delta OD/min$). Como se observa en la figura III.7 la velocidad de reacción, mostró un incremento aproximadamente proporcional con la concentración de la enzima llegando hasta el valor de 10% v/v de extracto sobre la mezcla de reacción. De acuerdo a ello, en adelante se empleó 10% v/v de extracto para efectuar la determinación de actividad de APX.

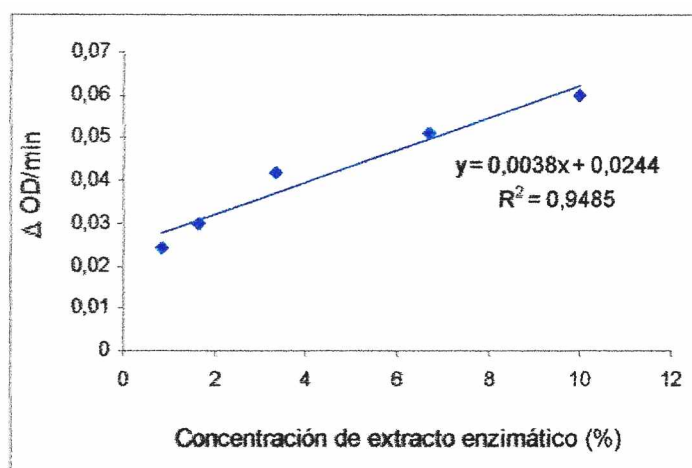


Figura III.7 Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de APX en función de las distintas concentraciones de extracto enzimático

III.4.2.2. Cambios de la actividad APX durante el almacenamiento de los frutos

Inmediatamente después del tratamiento los frutos presentaron una actividad aproximadamente 20 % mayor a los controles (figura III.8). Los frutos control incrementaron la actividad de APX al día 7, un 14 % mayor con respecto al día inicial, luego la actividad disminuyó alcanzando un valor inferior al inicial (aproximadamente 20 %) como se aprecia en la figura III.8. A lo largo del almacenamiento los pimientos tratados presentaron una actividad significativamente mayor (aproximadamente 1,2 veces) a los controles. Barka (2001) también reportó una mayor actividad de APX en tomate tratado con luz UV-C con respecto a los controles luego del tratamiento y durante el almacenamiento.

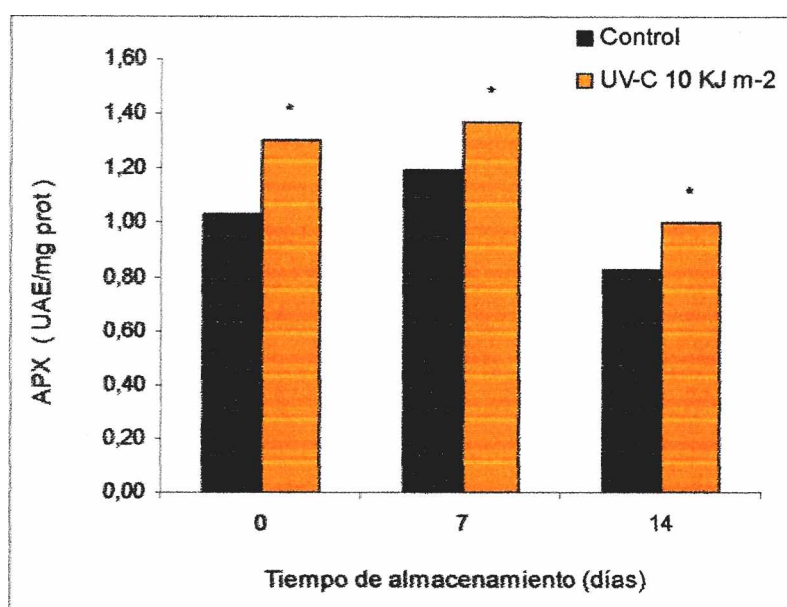


Figura III.8. Evolución de la actividad específica de APX en función del tiempo de almacenamiento a 0°C de frutos control y tratados con UV-C (dosis 10KJ/m²). El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 0,15$. $UAE_{APX} = 1 \mu\text{mol Ascorbato oxidado/min}$

APX es considerada como una enzima primaria en el secuestro de H₂O₂ en compartimentos como el citosol y cloroplastos (Barka, 2001) y que utiliza ácido ascórbico como co-sustrato. Los datos hallados aquí muestran que la exposición a tratamiento UV-C en pimiento provoca un incremento en la actividad de APX y que ésta se mantiene durante el período de almacenamiento en niveles superiores que la hallada en los frutos control. Sala y Lafuente (1999) relacionan cambios en la actividad de las enzimas secuestradoras de EROs con un proceso de adaptación inducido por el estrés abiótico al que es sometido un fruto, de

esta manera el tejido genera resistencia a las bajas temperaturas de almacenamiento. Podría haber una producción ligeramente mayor de H_2O_2 , la que actuaría como molécula de transmisión de señales para que el tejido reaccione frente al estrés al que fue sometido (Blokhina y col., 2002).

De todos modos resulta importante mencionar que la mayor actividad APX no correlaciona con los cambios en los niveles de AsA y ADA descritos en el Capítulo II. Esto podría implicar o bien que *in vivo* este incremento en la actividad enzimática no se traduce en una mayor metabolización de H_2O_2 con la consecuente acumulación de ADA en detrimento de la forma reducida, o bien que se encuentra altamente activo el sistema de regeneración del AsA. Si bien este aspecto no fue evaluado en el presente trabajo resultaría de interés realizar futuros estudios a fin de determinar si existen diferencias en la capacidad de regeneración del AsA entre frutos control y tratados con UV-C.

III.4.3. CATALASA (CAT)

III.4.3.1. Optimización de las condiciones de reacción

Efecto de la concentración de sustrato: se evaluaron concentraciones de H_2O_2 entre 6 y 20 mM, sobre la actividad de CAT. Como se observa en la figura III.9 se alcanzó un valor constante a partir de 15 mM de H_2O_2 . Por esta razón una concentración de 15 mM de H_2O_2 se seleccionó para utilizar en futuras determinaciones de la actividad de CAT.

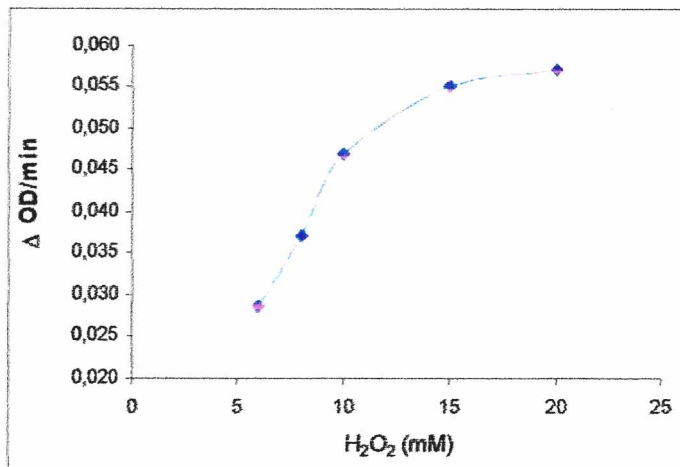


Figura III.9. Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de CAT en función de las distintas concentraciones de H_2O_2 .

Efecto de la concentración de enzima: Como se observa en la figura III.10 la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) mostró un incremento aproximadamente proporcional hasta el agregado de 25 % v/v de extracto. De acuerdo a ello, en adelante se empleó 25% v/v de extracto para efectuar la determinación de actividad de CAT.

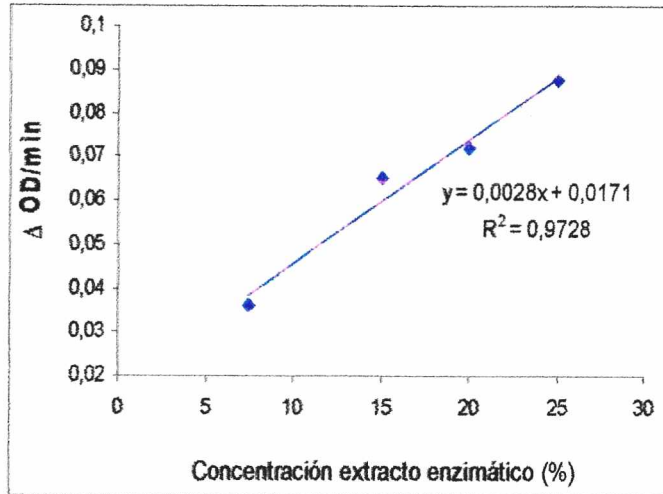


Figura III.10. Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de CAT en función de los distintos porcentajes de extracto enzimático

Curva de calibración de H_2O_2 : En la figura III.11 se muestra la variación de absorbancia debida a la formación del complejo $Ti-H_2O_2$ en función de la concentración de H_2O_2 en presencia y ausencia del extracto enzimático inactivado por ebullición. En ella puede verse que las pendientes de las rectas son diferentes, lo que implica un efecto de la matriz del extracto vegetal. Por ello se decidió utilizar una curva de calibración que incluyera el extracto con enzima inactivada.

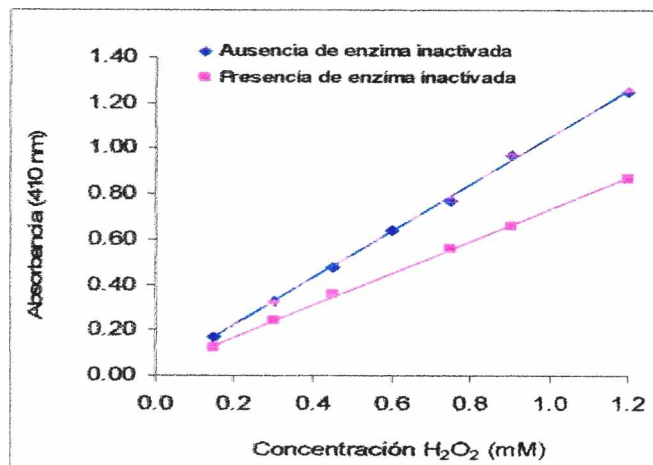


Figura III.11. Formación del complejo $Ti-H_2O_2$ en función de la cantidad de H_2O_2 empleada, en presencia y ausencia de enzima inactivada.

Estabilidad del complejo Ti-H₂O₂: como se observa en la figura III.12, al medir la absorbancia del complejo formado por reacción del catión titanio y H₂O₂ a diferentes tiempos, los valores se mantuvieron constantes, comprobándose la estabilidad del complejo en el tiempo.

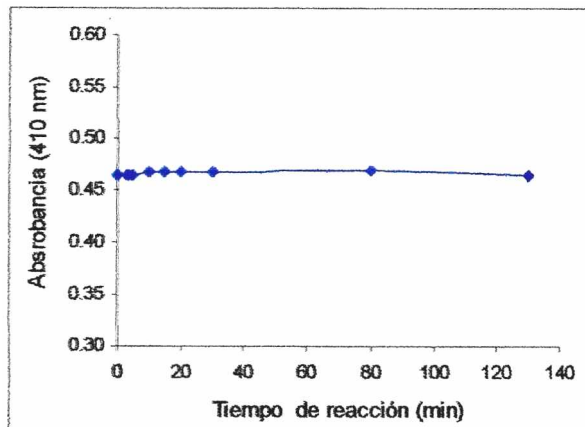


Figura III.12. Estabilidad del complejo Ti-H₂O₂ en el tiempo, empleando una mezcla de reacción en ausencia de extracto enzimático.

III.4.3.2. Cambios de la actividad CAT durante el almacenamiento de los frutos

Inmediatamente después del tratamiento los frutos presentaron una actividad aproximadamente 1,7 veces mayor a la de los controles (figura III.13).

En los frutos control la actividad de CAT al día 7 aumentó un 23 %, luego la actividad disminuyó marcadamente hacia el final del almacenamiento. Por su parte los pimientos tratados también mostraron un descenso en la actividad CAT durante el almacenamiento, pero esta se mantuvo en todos los casos en niveles significativamente superiores a los hallados en los controles.

Debe resaltarse que luego del tratamiento UV y previo al almacenamiento, las actividades de APX y CAT se vieron incrementadas, indicando que existiría un aumento del contenido de H₂O₂ debida a la radiación UV-C. Pero, prácticamente no se observó variación de la actividad de SOD, sugiriendo que el H₂O₂ no provendría exclusivamente de la dismutación del O₂[•] provocada por SOD, sino que evidentemente tendría otro origen. Murage y Masuda (1997) proponen que el H₂O₂ podría ser generada en los peroxisomas por la enzima glicolato oxidasa. La producción de H₂O₂ está relacionado con la integración de los procesos celulares y la adaptación a estímulos ambientales (Foyer y col., 1994). Si bien bajo condiciones normales la célula produce H₂O₂, diversos tipos de estrés biótico o abiótico que afectan la homeostasis celular provocan el incremento de las EROs (Mittler, 2002). En tomates, se ha observado un aumento de los niveles de H₂O₂ en respuesta al tratamiento con UV-C (Barka y col., 2000).

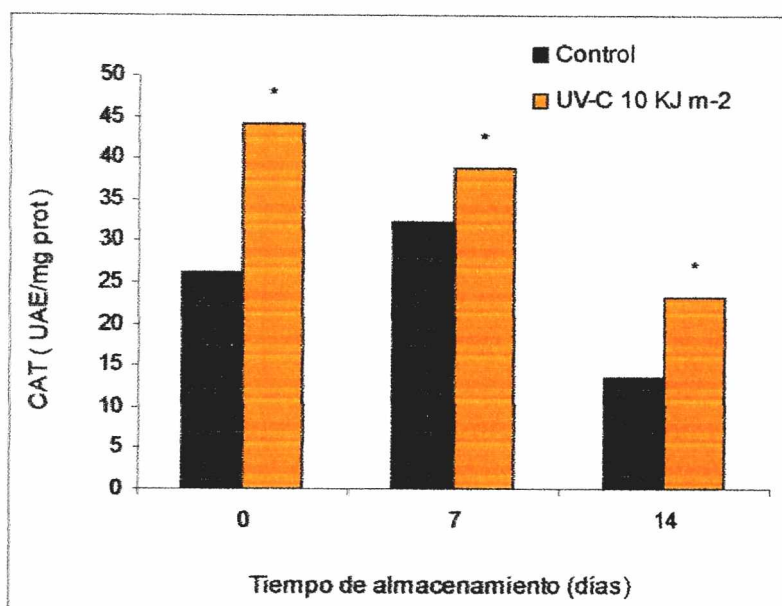


Figura III.13. Evolución de la actividad específica de CAT en función del tiempo de almacenamiento a 0°C de frutos control y tratados con UV-C (dosis 10 KJ/m²). El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$. $LSD_{0,05} = 3,72$. $UAE_{CAT} = 1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ consumido/min}$.

En resumen, en el presente trabajo se observó un patrón similar de comportamiento de CAT y APX en el sentido de presentar mayores niveles en los frutos tratados que en los frutos control. Si bien tanto APX como CAT poseen la capacidad de metabolizar excesos de H₂O₂ las diferencias entre ambas se asocian tanto con funciones en diferentes compartimientos celulares como en la afinidad por el sustrato. Con respecto al primer punto CAT se halla presente en peroxisomas y mitocondria, mientras que APX se ha identificado en citosol, apoplasto, mitocondria y plástidos. Con relación a la afinidad por el H₂O₂ de ambas enzimas a partir de las curvas descritas anteriormente (figuras III.5 y III.9), y con la limitante de haber trabajado con extractos crudos, podría inferirse que los valores de K_m serían superiores para CAT que para APX. Esto se ha observado en otras especies y se ha sugerido que las diferentes afinidades de APX y CAT por el H₂O₂ podría asociarse a funciones diferenciales para ambas enzimas: APX participando en la regulación fina de EROs y CAT con importantes funciones en condiciones de elevada acumulación (Mittler, 2002). También puede pensarse que el H₂O₂ producido en el espacio intercelular durante el estrés abiótico, difundiría primero al citosol donde APX está localizada (Barka, 2001), y luego difundiría al peroxisoma donde típicamente se localiza CAT. Por otro lado, el tratamiento UV-C provoca una proliferación de peroxisomas (Mittler, 2002) y eso permitiría un mejor y más eficiente secuestro de H₂O₂. Además, la presencia de activadores

o inhibidores *in vivo*, la compartimentalización entre enzimas y sustratos puede ser determinante del rol específico de cada enzima. Independientemente de que resulta difícil inferir directamente la capacidad de detoxificación de EROs *in vivo*, solamente a partir de determinaciones de actividad enzimática *in vitro*, las respuestas halladas en los frutos tratados muestran una clara tendencia a incrementar la actividad de enzimas vinculadas con la detoxificación de H_2O_2 . Incrementos en ambas enzimas han sido asociados con una mejor tolerancia a condiciones de estrés oxidativo (Murgia y col., 2004) y más específicamente de estrés por bajas temperaturas (Sala y Lafuente, 1999).

III.4.4. PEROXIDASA (POX)

III.4.4.1. Optimización de las condiciones de reacción

Efecto de la concentración de H_2O_2 : se evaluaron concentraciones de H_2O_2 entre 2 y 20 mM, sobre la actividad de POX. Como se observa en la figura III.14 la actividad POX mantuvo un valor aproximadamente constante hasta una concentración 12 mM de H_2O_2 a partir del cual se observó una disminución de la actividad de la enzima. Por esta razón se utilizó una concentración de 8 mM de H_2O_2 para futuras determinaciones de la actividad de POX.

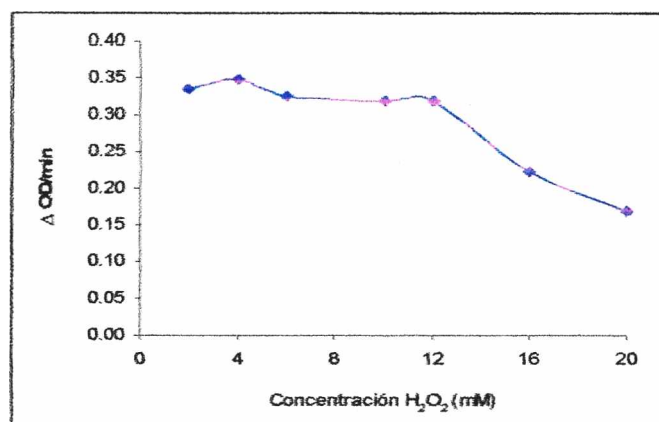


Figura III.14. Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de POX en función de las distintas concentraciones de H_2O_2 .

Efecto de la concentración de sustrato (guayacol): se evaluaron concentraciones de guayacol entre 0,1 y 0,5%, sobre la actividad de POX. Como se observa en la figura III.15 se alcanzó un valor constante a partir de 0,25% de guayacol. Por esta razón, 0,25% fue la concentración elegida para futuras determinaciones de la actividad de POX. Cabe resaltar que

a partir de 0,4% la solución de guayacol presentaba turbidez imposibilitando su aplicación para la medida enzimática.

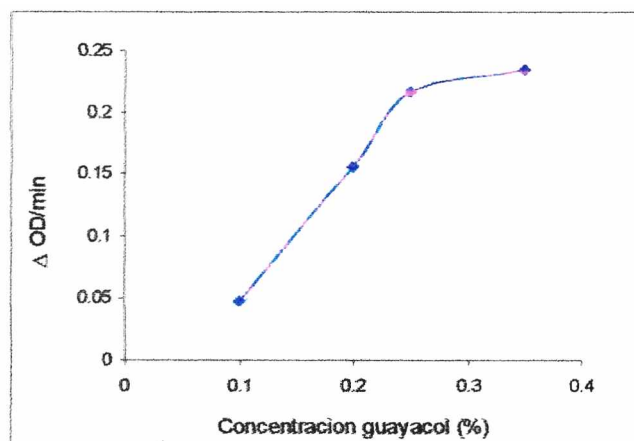


Figura III.15. Variación de la velocidad de reacción ($\Delta OD/min$) de POX en función de las distintas concentraciones de guayacol.

III.4.4.2. Cambios de la actividad POX durante el almacenamiento de los frutos

Como se observa en la (figura III.16), inmediatamente después del tratamiento UV-C se produjo un aumento en la actividad de POX, aproximadamente un 12% más que en los controles, una respuesta similar se observó en tomates irradiados con UV-C (Barka, 2001).

Los pimientos controles presentaron un máximo de actividad al día 7, aproximadamente un 50% respecto al inicio de la experiencia, luego disminuyó aproximadamente un 40% en el final del almacenamiento alcanzando un valor similar al inicial (día 0). En los frutos tratados la actividad de POX se mantuvo constante durante 7 días, mientras que, hacia el final del almacenamiento se produjo una disminución significativa de la actividad de aproximadamente un 30%, llegando a ser prácticamente similar a la actividad POX de los frutos control.

El incremento en la actividad POX hallado en los frutos tratados inmediatamente a finalizado el tratamiento podría asociarse tanto con la reducción en los niveles de fenoles mostrada en el Capítulo II (figura II-7) como con un hipotético incremento de H_2O_2 . Esto muestra un correlato con lo ocurrido en APX y CAT, es decir una tendencia a incrementar la actividad de estas enzimas asociadas a la detoxificación de H_2O_2 como rápida respuesta luego de la irradiación UV-C. Por el contrario, a los 7 d de almacenamiento a $0^\circ C$ la actividad de POX en los frutos control mostró mayor actividad que los frutos tratados difiriendo de lo observado en APX y CAT.

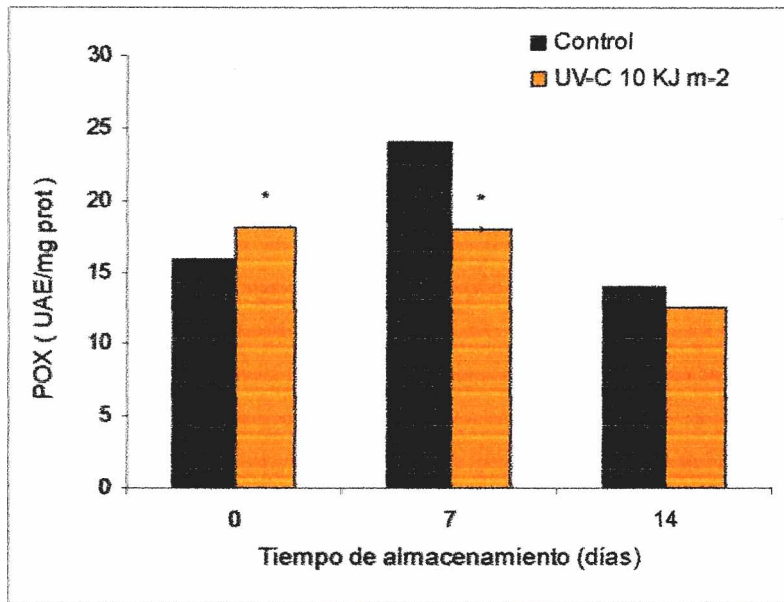


Figura III.16. Evolución de la actividad específica de POX en función del tiempo de almacenamiento a 0°C de frutos control y tratados con UV-C (dosis 10 KJ/m²). El asterisco indica que el valor es significativamente diferente del correspondiente control con una $p < 0.05$.
 $LSD_{0.05} = 2.30$ $UAE_{POX} = \Delta OD/min$

La ubicación de POX en vacuolas, tonoplasto, plasmalema, “dentro y fuera” de la pared celular (Thongsook y Barret, 2005), podría ser una causa de la estabilidad de esta enzima durante la primera semana de almacenamiento en los frutos tratados, es decir, que la eliminación de EROs estaría ocurriendo por acción de APX y CAT, principalmente. La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes al final del almacenamiento, podría relacionarse con la pérdida de la capacidad de la célula para la eliminación enzimática de EROs, como lo sugiere Barka (2001), es decir que en el tejido se estaría produciendo acumulación de EROs.

La determinación del rol biológico de las alteraciones en varios componentes del sistema de defensa antioxidante sobre la protección contra el estrés ocasionado por bajas temperaturas resulta compleja. Esto es entre otras cosas debido al: 1) el alto grado de compartimentalización de antioxidantes y producción de EROs a nivel celular y a que 2) muchos otros aspectos no analizados podrían ser responsable *in vivo* del inicio de las alteraciones por frío (ej. alteraciones en la funcionalidad del citoesqueleto, incremento en la energía de activación de enzimas

cruciales para el metabolismo, etc) y de la disminución de la susceptibilidad al mismo por la radiación UV-C (ej cambios en actividad de oxídasa alternativa, acumulación de solutos compatibles, facilitación del movimiento de EROs para evitar su acumulación exacerbada en ciertos compartimientos, etc).

Más allá de las cuestiones expresadas recientemente, el tratamiento UV-C indujo mayor actividad de APX, CAT y POX, en el día 0 (inmediatamente después del tratamiento). La activación de estas enzimas, incrementaría la protección celular ante el daño oxidativo y por tanto estaría confiriendo resistencia al fruto frente al estrés posterior asociado a la baja temperatura de almacenamiento (0°C) y de esta manera el desarrollo de los síntomas de DPF se verían retrasados.

III. 5. CONCLUSIONES

- El presente trabajo permitió optimizar las condiciones para la determinación de la actividad de las enzimas vinculadas al metabolismo oxidativo en pimiento.
- El tratamiento UV-C provocó modificaciones en la actividad de las enzimas vinculadas al metabolismo oxidativo. Inmediatamente luego del tratamiento, se observó un aumento en la actividad de enzimas asociadas a la detoxificación de H_2O_2 pero no de O_2^- . Posteriormente durante el almacenamiento, los frutos tratados mantuvieron niveles significativamente superiores de actividad APX y CAT respecto del control. Asimismo, en estadios intermedios de almacenamiento los frutos tratados mostraron un incremento en la actividad SOD.



BREVE DISCUSION Y CONCLUSIONES FINALES

EFFECTO DE UV-C SOBRE LA CALIDAD Y DPF DE PIMIENTO:

La aplicación de la radiación UV-C en poscosecha, se ha empleado en general como una alternativa al tratamiento químico fungicida para controlar la incidencia de enfermedades de poscosecha de los productos (Rodov y col., 1992; D'ahllewin y col, 2000) y para retardar los procesos de maduración y senescencia (Maharaj y col., 1999; Liu y col., 1991; Gonzalez-Aguilar y col., 2004). Los resultados del presente trabajo muestran claramente que los tratamientos UV-C en pimientos resultan además en una disminución en la manifestación de un desorden fisiológico de importancia desde el punto de vista del almacenamiento refrigerado poscosecha como lo es el daño por frío (DPF). Asimismo, los tratamientos en las dosis ensayadas en pimiento (10 kJ/m²), redujeron la pérdida de peso y no ocasionaron alteraciones indeseables en el desarrollo de color (ej. degradación de carotenoides). González-Aguilar y col. (2007a y 2004) reportaron la efectividad de la radiación UV-C para retrasar el DPF en otros frutos como mango y durazno.

EFFECTO DE LA EXPOSICION A RADIACION UV-C SOBRE ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS Y NO ENZIMATICOS EN PIMIENTO

La realización de este estudio permitió avanzar en el conocimiento de la respuesta de los tejidos vegetales a la radiación UV-C. En ese sentido se observa claramente que en respuesta a los tratamientos con radiación UV-C se producen cambios significativos en el metabolismo oxidativo de los frutos. Estas modificaciones si bien ocurren en un continuo, acompañando la evolución de los frutos durante el almacenamiento, podrían diferenciarse 2 etapas en la respuesta: en principio una serie de modificaciones a tiempos cortos y posteriormente cambios que ocurren en períodos intermedios del almacenamiento a bajas temperaturas, en los cuales comienza a manifestarse el DPF. En primer término, inmediatamente luego de los tratamientos se observó un ligero incremento en la peroxidación lipídica (medido como contenido de TBARS) que no se tradujo en sintomatología deletérea en los frutos, asociada con una rápida respuesta desde el punto de vista enzimático en el sentido de incrementar la actividad de proteínas vinculadas con la detoxificación de H₂O₂ y no de O₂⁻. Por su parte, dentro de los componentes no enzimáticos se observó una reducción en los niveles de compuestos fenólicos, probablemente debida al incremento registrado de actividad de la enzima POX. Asimismo, no se observó variación en los niveles de AsA y siendo éste el mayor contribuyente del poder anti-radical (PA), explicaría por qué no se observó una variación en el PA inmediatamente al

tratamiento UV-C. Los resultados descritos sugerirían que los frutos tratados estarían en mejores condiciones metabólicas para enfrentar el estrés posterior por baja temperatura.

En la medida que el proceso de almacenamiento progresó y comenzó a manifestarse el desorden fisiológico (primeros 7 días a 0°C), la peroxidación lipídica progresó en los frutos control, mientras que el contenido de fenoles totales disminuyó ligeramente, el de flavonoides permaneció constante, el de AsA aumentó y ADA no varió. Estos dos últimos resultados indicarían que la síntesis y/o la regeneración de AsA continuaron activas durante la inducción del DPF. Por otra parte, la actividad de CAT, APX y POX aumentaron y la de SOD no cambió respecto al valor inicial. El no incremento de la actividad SOD podría indicar una posible acumulación de O_2^- . En tanto, en los frutos tratados se hallaron mayores niveles de actividad de las enzimas antioxidantes, excepto POX, respecto a los frutos control, esto refleja una mejor condición para captar radicales O_2^- y H_2O_2 generados por ambos tipos de estrés a los que fueron sometidos (radiación UV-C y baja temperatura).

A tiempos más largos de almacenamiento las actividades de las enzimas antioxidantes disminuyeron tanto en frutos control como en tratados, aunque en estos últimos se mantuvieron más altas. Con relación a los antioxidantes no enzimáticos, si bien los compuestos fenólicos en esta etapa, alcanzaron mayores niveles en los frutos tratados no parecen contribuir marcadamente, al menos en pimiento, a la capacidad anti-radical (PA), a diferencia de AsA que si contribuye al PA y se mantuvo en mayores niveles en los frutos tratados. Cabe destacar que los mayores niveles de AsA y el ligero incremento de ADA encontrados indicarían que la síntesis de AsA permanecería activa en los frutos tratados, aún a tiempos largos de almacenamiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo explicarían el menor desarrollo de síntomas de daño por frío en los pimientos tratados.

ROL DEL DAÑO OXIDATIVO Y DE LA PROTECCION CONTRA EL MISMO EN LA INCIDENCIA DEL DPF EN PIMIENTO

Con relación al potencial rol del daño oxidativo en el DPF, la extracción de conclusiones al respecto debe realizarse con precaución. Numerosos trabajos han mostrado que en respuesta a condiciones de estrés moderado se producen modificaciones en el metabolismo oxidativo de los tejidos vegetales. Inclusive esto se ha observado específicamente en ciertos casos en

repuesta a la radiación UV-C (Barka y col., 2000; Cisneros Cevallos, 2003). De todos modos, la inferencia del rol *in vivo* de estos cambios en los niveles de antioxidantes, en algunos casos puede haber sido sobreestimada (Noctor y Foyer, 1998). Por un lado, debido el alto grado de compartimentalización y complejidad a nivel celular (especialmente válido para el metabolismo redox) determina que las mediciones a nivel de tejido (ej. AsA total, fenoles totales, APX, CAT, SOD, POX) puedan dar lugar a sobre-simplificaciones o conclusiones erróneas.

Por ejemplo, los resultados obtenidos en los niveles de TBARS sugieren que tanto los frutos controles como tratados con UV-C mostraron un aumento de peroxidación lipídica a los 7 y 14 d de almacenamiento, cuando los síntomas de DPF comenzaron a manifestarse. Esto podría sugerir *a priori* que el estrés oxidativo en membranas estaría vinculado con el DPF en pimiento. De todos modos, no pueden excluirse otras posibilidades como: 1) el deterioro oxidativo en otros constituyentes celulares como proteínas y/o ácidos nucleicos que, se sabe son blancos de las EROs, y que se traducen en las alteraciones iniciales a nivel celular, o 2) que la iniciación del DPF se asocia con el daño oxidativo a nivel de las membranas de ciertos compartimientos subcelulares específicos. De hecho, algunos trabajos han mostrado que la mitocondria en ciertos casos sería el principal blanco del daño oxidativo (Bartoli y col., 2004).

OTROS ASPECTOS A TENER EN CUENTA Y QUE PODRIAN AMERITAR NUEVOS ESTUDIOS:

Debe tenerse en cuenta que resulta posible que otros aspectos no analizados en el presente estudio también se encuentren asociados con la menor susceptibilidad al DPF en pimientos tratados con radiación UV-C. Uno de ellos podría ser la vía de la oxidasa alternativa. A diferencia de animales donde el flujo de electrones hacia el oxígeno es inhibido completamente por el cianuro, en plantas existe una oxidasa alternativa capaz de realizar un 'by pass' de los complejos III y IV (Bartoli y col., 2000) catalizando la oxidación de ubiquinol. En este proceso la oxidasa alternativa estaría involucrada en reducir las EROs a través de no permitir el flujo de electrones que reducen el O_2 a O_2^- (Møller, 2001). Este concepto de oxidasa alternativa como enzima antioxidante ha sido mostrado en mitocondrias de pimientos (Purvis y col., 1997) y células de tabaco (Maxwell y col., 1999). Así mismo, fue propuesto que la oxidasa alternativa mediaría el DPF manteniendo la producción de EROs en balance con los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Purvis y col., 1995). Fung y col. (2004) mostraron que pre-tratamientos con metil jasmonato y metil salicílico sobre pimientos almacenados a 0°C,

indujeron una mayor y temprana acumulación de transcriptos de oxidasa alternativa que en los frutos control, y proponen que esto contribuiría a reducir la incidencia del DPF. De tal modo, podría especularse un mecanismo similar para los frutos tratados con radiación UV-C ameritando un estudio posterior.

Otro aspecto no cubierto en el presente estudio pero que resultaría de interés considerar en relación con la compartimentalización de antioxidantes, es el posible rol de las acuaporinas en el transporte de H_2O_2 . Un importante rol biológico de las membranas es el de actuar como barrera entre organelas y células separando compartimientos y rutas bioquímicas. Es así que EROs cargadas como el O_2^- presentan una muy limitada capacidad de movilidad entre compartimientos. En el caso del H_2O_2 , si bien por tratarse de una molécula no cargada, hidrofílica y de bajo peso molecular posee mayor posibilidad de difundir a través de membranas, pero la presencia de dipolos permanentes hace que ésta sea limitada, como ocurre para el agua. Las acuaporinas son proteínas capaces de generar en membranas canales que facilitan el flujo pasivo de agua entre compartimientos celulares (Chrispeels y Agre, 1994). Si bien se conoce el rol de las acuaporinas en el movimiento de agua a través de membranas, recientemente se ha demostrado la difusión de H_2O_2 a través de estos canales (Bienert y col., 2007). El control más fino del movimiento de H_2O_2 parece tener sentido sobre todo considerando que ha sido demostrado que esta molécula en bajas concentraciones puede actuar como mensajero secundario a nivel celular (Orozco Cárdenas y col., 2001). Resulta interesante mencionar que en respuesta al estrés por bajas temperaturas se han descrito, en raíces de maíz, incrementos en la abundancia de acuaporinas (Aroca y col., 2005). El aumento de acuaporinas se observó en forma similar en cultivares de maíz susceptibles y tolerantes a las bajas temperaturas y las diferencias más importantes entre los genotipos se observaron a nivel de la acumulación de H_2O_2 lo que llevó a los autores a concluir que el sistema de detoxificación de EROs sería importante en la determinación del mejor desempeño de las plantas tolerantes. No obstante, resulta posible especular que este incremento de acuaporinas en respuesta a las bajas temperaturas, podría asociarse con un potencial rol de las mismas en redistribuir las EROs, facilitando su detoxificación por enzimas específicas ubicadas en otros compartimientos y con ello moderar su acumulación en sitios donde la capacidad de metabolización sea limitada.

COROLARIO

Más allá de la complejidad mencionada, resulta claro que los tratamientos UV-C en pimiento resultaron en una significativa disminución del deterioro ocasionado por el estrés por bajas temperaturas y que dichos tratamientos ocasionaron marcadas modificaciones en el sistema de defensa antioxidante. Esto determinó que los frutos tratados presentaran, durante el almacenamiento, una mayor actividad de enzimas antioxidantes, contenido de AsA y de compuestos fenólicos.



REFERENCIAS

- Agar, I.T.; Massantini, R.; Hess-Pierce, B. y Kader, A.A., (1999). Postharvest CO₂ and ethylene production and quality maintenance of fresh-cut kiwifruit slices. *J. Food Sci.* 64, 433–440.
- Agius, F.; González-Lamothe, R.; Caballero, J.L.; Muñoz-Blanco, J.; Botella, M.A y Valpuesta, V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat. Biotech.* 21, 177-181.
- Algaba, I.M. (2005). Protección ultravioleta proporcionada por los textiles: estudio de la influencia de las variables más significativas y aplicación de productos específicos para su mejora. Tesis doctoral. Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Allende, A. y Artés, F. (2003). UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. *Food Res. Int.* 36, 739-746.
- Alscher, R. G.; Erturk, N. y Heath, L. S., (2002). Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.* 53, 1331-1341.
- Alzamora, S.M. (2007). Consultado el 13 de octubre de 2007. Tecnología de conservación. La radiación ultravioleta. Una alternativa "no térmica" para la pasterización de jugos. [en línea]. http://ialimentaria.com/publicaciones/articulos/IA68_S7.pdf
- Anónimo (2001). Consultado el 10 de octubre del 2007. Artículo: Antioxidantes y estrés oxidativo. [en línea]. <http://www.inha.sld.cu/Documentos%20y%20Antioxidantes.doc>
- Anza, M.; Riga, P. y Garbisu, C. (2005). Time course of antioxidant responses of *Capsicum annuum* subjected to a progressive magnesium deficiency. *Ann. Applied Biol.* 146, 123–134.
- Artés, F. (1995). Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. I Pretratamientos térmicos. *Rev. Esp. Ciencia Tecnol. Alim.* 35, 45-64; 35, 139-149 y 35, 247-269
- Aroca, R.; Amodeo, G.; Fernández-Illescas, S.; Herman, E.M.; Chaumont, F. y Chrispeels M.J. (2005). The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.* 137, 341–353.
- Amigoni, O. y De Tullio, M.C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Review. Biochim. Biophys. Acta* 1569, 1-9
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase - hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235-241.
- Barka, E. A. (2001). Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits in response to low amounts of UV-C. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 785–791

- Barka, E. A.; Kalantari, S.; Makhlof, J. y Arul, J. (2000). Effects of UV-C irradiation on lipid peroxidation markers during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 147–152.
- Barth MM y Zhuang, Z.A. (1996). Packaging desing affects antioxidants vitamin retention and quality of broccoli postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol* 9, 141-150.
- Bartoli, C.G.; Pastori, G.M. y Foyer, C.H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* 123, 335–343.
- Bartoli, C.G.; Gómez, F.; Martínez D.E. y Guiamet JJ. (2004). Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) . *J. Exp. Bot.* 55, 1663-1669.
- Beta, T.; Nam,S.; Dexter, JE. y Sapiststein, HD. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chem.* 82(4), 390–393
- Bienert GP.; Møller, A.L.B.; Kristiansen, K.A.; Schulz, A.; Møller, I.M.; Schjoerring, J.K. y Jahn, T.P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes *J. Biol. Chem.* 282, 183-1192.
- Blokhina, O.; Virolainen, E. y Fagerstedt, K. (2002). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprovation stress: a review. *Annals of Bot.* 91, 179-194.
- Bolson J.R. (1999). Light compendium-ultraviolet: principles and applications – USEPA – Newsletter. 66, 9- 37
- Boveris, A. (2005). Evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm.* 46 (1): 85-95.
- 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
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25–30.
- Cafaro, M. J. (2005). Inducción de la senescencia en plantas de trigo y arroz. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Belgrano.
- Cantwell, M. (2002). Consultado el 15 de octubre de 2007. Indicadores básicos del manejo poscosecha de pimiento. Departamento de Productos Vegetales. Universidad de California, Davis, USA. [en línea]. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Pepper.html>
- Castillo, C.; Benedito, J. L. y López-Alonso, M. (2001). Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. med. vet.* 33, 5-20.

- Céspedes-Miranda, E.M.; Hernández-Lantigua, I. y Llopiz-Janer, N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa, *Rev Cubana Invest Bioméd.* v.15 n.2 Ciudad de la Habana jul.-dic.
- Chisari, M.; Barbagallo, N. R. y Spagna, G. (2007). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 55, 346-347.
- Chrispeels, M.J. y Agre, P. (1994) Aquaporins: water channel proteins of plants and animals cells. *Trends Biochem. Sci.* 19, 421-425.
- Cia, P.; Pascholati, S.F.; Benato, E.A.; Camili, E.C. y Santos C. (2007). Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 366-373.
- Cisneros-Zevallos, L. (2003). The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 68, 1560-1564.
- CMCBA (2004). Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. Consultado el 24 de octubre de 2007. Compatibilidad para almacenaje o transporte de frutas y hortalizas frescas en periodos cortos. [en línea]. <http://www.webpicking.com/hojas/frutas.htm>
- Conaproch [sin fecha]. Consultado el 15 de octubre de 2007. Consejo Nacional de Productores de Chile, S.C. MEXICO. Situación de los chiles en México. [en línea]. http://www.conaproch.org/ch_situación_nacional.htm
- Chrispeels, M.J. y Agre, P. (1994) Aquaporins: water channel proteins of plants and animals cells. *Trends Biochem Sci* 19, 421-425.
- Costa, L.; Vicente, A. R.; Civello, P. M.; Chaves, A. R. y Martínez, G. A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 204-210.
- Dai, Q.; Yan, B.; Huang, S.; Liu, X. y Peng, S. (1997). Response of oxidative stress defense system in rice (*Oryza Sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiol. Plant.* 101, 301-308.
- D'hallewin, G.; Schirra, M.; Pala, M. y Ben-Yehoshua, S. (2000). Ultraviolet C irradiation at 0.5 kJ/m² reduces decay without causing damage or affecting postharvest quality of star ruby grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *J. Agric. Food Chem.* 48, 4571-4575.
- D'hallewin G.; Schirra, M.; Manueddu, M.; Piga, S. y Ben-Yehoshua, S. (1999). Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 124, 702-707.

- Deepa, N.; Kaur, C.; Singh, B. y Kapoor, H. (2006). Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *J. Food Comp. Anal.* 19, 572-578.
- Díaz, J.; Pomar, F.; Bernal, A. y Merino, F. (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annum* L. *Phytochem. Rev.* 3, 141-157.
- Du, Z. y Bramlage, W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. food Chem.* 40, 1566-1570.
- Du, Z. y Bramlage, W.J. (1995). Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. *HortScience* 30, 205-209.
- Educarchile [sin fecha]. Consultado el 15 de octubre de 2007. Situación mundial del cultivo del pimiento. [en línea]. <http://www.educarchile.cl/mundialdelcultivodelpimiento.doc>
- Erkan, M.; Wang, C. Y. y Krizek, D.T. (2001). UV-C irradiation reduces microbial populations and deterioration in *Cucurbita pepo* fruit tissue. *Env. Exp. Bot.* 45, 1-9.
- FAO. (2006). Consultado el 15 de octubre de 2007. Fichas Técnicas, Productos Frescos y Procesados, Pimiento (*Capsicum annum*). [en línea]. <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/PIMIENTO.HTM>
- Fennema. (2000). Química de los Alimentos, 2da. Edición, Zaragoza España. Pág. 64-65
- Fernández-Trujillo, J.P. (2000). Apuntes del VI Curso superior de ingeniería y aplicaciones del frío a las conservas vegetales. Tema 59. Frutos de Hueso. Murcia, España.
- Flurkey, W.H. y Jen, J.J. (1978). Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.* 43, 1826-1828.
- Foyer, CH.; Descourvieres, P. y Kunert, K.J. (1994) Protein against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* 17, 507-523
- Fung, R.W.M.; Wang, C.Y.; Smith, D.L.; Gross, K.C. y Tian, M. (2004). MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annum* L.). *Plant Sci.* 166, 711-719.
- Giannopolitis, C.N. y Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Gong, Y.; Toivonen, P.M.A.; Wiersma, P.A. y Lu, C. (2000). Effect of freezing on the activity of catalase in apple flesh tissue. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5537-5542.
- González-Aguilar, L.; Ganoso, L.; Cruz, R.; Fortiz, J.; Báez, R. y Wang, C.Y. (2000). Polyamines induced by hot water treatments reduce chilling injury and decay in pepper fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 18, 19-26.

- González-Aguilar, G.A.; Wang, C.Y.; Buta, J.G. y Krizek, D.T. (2001). Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe "Tommy Atkins" mangoes. *Int. J. Food Sci. Tech.* 36, 767-773.
- González-Aguilar, G.A.; Wang, C. y Buta, G. (2004). UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 84, 415-442.
- González-Aguilar, G.; Zavaleta-Gatica, R. y Tiznado-Hernández, M.E. (2007a). Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharv Biol. Technol.* 45, 108-116.
- González-Aguilar, G.A.; Villegas-Ochoa, M.A.; Martínez-Téllez, M.A.; Gardea, A.A. y Ayala-Zavala, J. F. (2007b). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *J. Food Sci.* 72, 197-202.
- Hardenburg, R.; Watada, A. y Wang, C. (1990). The commercial storage of fruits vegetables and florist and nursery stocks. Agricultural Handbook. N°66. USDA. En: <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/>
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R. y Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.
- Hideg, E. (2004). Detection of free radicals and reactive oxygen species. *Meth. Mol.Biol.* 274, 249-260.
- Hideg, E. y Vass, I. (1996). UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci.* 115, 251 - 260.
- Infoagro, [sin fecha]. Consultado el 15 de octubre de 2007. [en línea]. El cultivo del pimiento, <http://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.asp>
- INTA (2000). Consultado el 15 de octubre de 2007. Horticultura. El cultivo de pimiento para pimentón: sus posibilidades en la región cuyana. [en línea]. <http://www.a-campo.com.ar/español/horticultura.htm>
- Jakubowski. (2006). Consultado el 25 de noviembre de 2007. Thermodynamics and IMFs in protein stability. Biochemistry. [en línea] www.employees.csbsj.edu
- Jang, I.C.; Park, S.Y.; Kim, K.Y.; Kwon, S.Y.; Kim, J.G. y Kwak, S.S. (2004). Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Phys. Biochem.* 42, 451-455.
- Javanmardi, J.; Stushno, C.; Locke, E. y Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem.* 83, 547-550.

- Jiménez, A.; Romojaro, F.; Gómez, JM.; Llanos, MR. y Sevilla, F. (2003). Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to storage at 20°C. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6293-6299.
- Kall, M.A. y Andersen, C. (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *J. Chrom.* 730, 101-111.
- Kehr, M.E. (2002). Susceptibilidad a daño por enfriamiento en poscosecha de pimiento y tratamientos para disminuir su efecto. *Agric. Técnica* 62, 509-518.
- Kendrick, J.R. y Bishop, D.G. (1986). The fatty acid composition of phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol of higher plants in relation to chilling sensitivity. *Plant Physiol.* 81, 946-949.
- Koca, H.; Ozdemir, F. y Turkan, I. (2006). Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon Esculentum* and *L. Pennellii*. *Biol. Plant.* 50, 745-748.
- Koo, H.M. y Suhaila, M. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempfeol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3106-3112.
- Kuo, M.C. y Kao C.H. (2003). Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol. Plant.* 46, 149-152.
- Lee, K. y Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest. Biol. Technol.* 20, 207-220.
- Lin, W.C.; Hall, J.W. y Saltveit, M.E. (1993). Ripening stage affects the chilling sensitivity of greenhouse-grown peppers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118, 791-795.
- Liu, J.; Stevens, C.; Khan, V.A. y Kabwe, M. (1991). The effect of ultraviolet irradiation on shelf-life and ripening of peaches and apples. *J. Food Qual.* 14, 299-305.
- López Camelo, A.F. (2003). Consultado el 24 de octubre de 2007. Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas, Del campo al mercado, ISSN 1020-4334, Boletín de servicios agrícolas de la FAO 151. [en línea].
<http://www.fao.org/docrep/006/Y4893S/y4893s00.HTM>
- Loweus, F.A. (1988). Ascorbic acid and its metabolic products. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 14. Preiss, J. (ed) Academic Press, New York, pp. 85-107.
- Luckey, T.D. (1980). Hormesis with ionizing radiation, CRC press, Boca Raton.
- Lyons, J.M. (1973). Chilling Injury in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24, 445-466.

- Lyons, J.M. y Raison, J.K. (1970). Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45, 386-389.
- Maharaj R.; Arul J. y Nadeau P. (1999). Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 13-23.
- Martínez, V. (2007). Consultado el 15 de octubre de 2007. Botanical, Alimentos naturales, El pimiento fuente de vitamina C y analgésico natural. [en línea]. <http://www.botanical-online.com/pimientos.htm>
- Martínez-Solano, J.R.; Sánchez-Bel, P.; Egea, I.; Olmos, E.; Hellin, E. y Romojaro, F. (2005). Electron beam ionization induced oxidative enzymatic activities in pepper (*Capsicum annuum* L.), associated with ultrastructure cellular damages. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8593-8599.
- Martínez-Valverde, I.; Perigao, M. J. y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. ALAN, vol.50, no.1, p.5-18. ISSN 0004-0622.
- Materska, M. y Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53 (5) 1750-1756
- Maxwell, D.P.; Wang, Y. y McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8271-8276.
- McKersie, B. (1996). Consultado el 02 de Julio de 2007. Oxidative stress. University of Guelph. [en línea]. <http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm>
- Meir, S.; Rosenberg, I.; Aharon, Z.; Grinberg, S. y Fallik, E. (1995). Improvement of the postharvest keeping quality and colour development of bell pepper (cv. 'Maor') by packaging with polyethylene bags at a reduced temperature. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 303-309.
- Mercado, L.G.; Castro, E. y García, E. (2003). Inhibición de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa apoplástica en frutos de chile tratados con ácido araquidónico. *Ciencia Nicolaita (Chile)*. No. 35, 93
- Mercier, J.; Baka, M.; Reddy, B.; Corcuff, R. y Arul, J. (2001). Shortwave ultraviolet irradiation for control of decay caused by *Botrytis cinerea* in bell pepper: Induced resistance and germicidal effects. *J. Am.Soc. Hort.Sc.* 126, 128-133.
- Miller, W.R. y Risse L.A.. (1986). Film wrapping to alleviate chilling injury of bell peppers during cold storage. *HortScience.* 21, 467-468.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.

- Møller I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591.
- Murage, E. N. y Masuda M. (1997). Response of pepper and eggplant to continuous light in relation to leaf chlorosis and activities of antioxidative enzymes. *Scientia Horticulturae*. 70, 269-279.
- Murgia, M. L.; Tarantino, H.; Vannini, P.; Bracale, R.; Carravieri y Soave. (2004). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J.* 38, 940-953.
- Nakano, Y. y Asada K. (1987). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Nasibi, F., M-Kalantari, KH. (2005). The effects of UV-A, UV-B and UV-C on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica napus*. *Irani. J. Sci. Technol. Trans.* 29, 39-48.
- Nigro, F.; Ippolito, A.; Lattanzio, V.; Venere, DD. y Salerno, M. (2000). Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *J Plant Pathology*. 82(1), 29-37
- Niknam, V.; Razavi, N.; Ebrahimzadeh, H. y Sharifzadeh, B. (2006). Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* Species. *Biol. Plant.* 50, 591-596.
- Noctor, G.; Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione : Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Odriozola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T. y Martín-Belloso, O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.* 105, 1151–1158.
- Orozco-Cárdenas, M.L.; Narváez-Vásquez, J. y Ryan, C.A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell.* 13, 179-191.
- Ou, M.; Hampsch-Woodill y Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619–4626.

- Pan, J.; Vicente, A. R.; Martínez, G. A.; Chaves, A. R. y Cívello, P. M. (2004). Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1831-1838.
- 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 Biochem.* 13, 127-153.
- Paull, R. (1990). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. p. 17-36. *In* Chilling injury of horticultural crops. Chien Yi Wang (2003). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Pérez-Trueba, G. (2003). Los flavonoides, antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 22, 48-57.
- Piga, A.; D'hallewin, G.; D'aquino, S. y Agabbio, M. (1998). Influence of film wrapping and UV irradiation on cactus pear quality after storage. *Packag. Tech. Sci.* 10, 59-68.
- Pomar, F.; Bernal, M.; Diaz, J. y Merino, F. (1997). Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochem.* 46, 1313-1317.
- Portero S., [sin fecha]. Consultado el 13 de octubre de 2007. Radiación ultravioleta. [en línea]. <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-fis/ultravioleta-morillo.pdf>
- Purvis, A.C. (1997). Role of alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria, *Physiol. Plant.* 100, 165-170.
- Purvis, A.C. (2001). Regulation and role of the alternative oxidase in chilling injury of green bell pepper (*Capsicum annuum* L.), *Acta Hort.* 553 289-291.
- Purvis, A.C.; Shewfelt, R.L.; y Gegogine, J.W. (1995). Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiol Plant.* 94, 743-749
- Raison, J.K. y Lyons, J.M. (1986). Chilling injury: a plea for uniform terminology. *Plant Cell Environ.* 9:685.
- Rani, P.; Meena Unni, K. y Karthikeyan, J. (2004). Evaluation of antioxidant properties of berries. *Indian J.Clin. Biochem.* 19, 103-110.
- Rodov, V.; Ben Yoshna, S.; Kim, J.J.; Shapiro, B. y Ittah, Y. (1992) Ultraviolet illumination induces scoparone production in Kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *J. Am. Soc.Hortic. Sci.* 117, 788-792.
- Rojas-Argudo, C.; Palou, L.; Cano, A.; Del Río, M.; González-Mas, M.C. y Bermejo, A. (2007). Efecto de la aplicación de rayos X a dosis moderadas sobre los componentes bioactivos de mandarinas 'Clemenules'. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. S1-O13, 29-36

- Ruelas, C.; Tiznado-Hernández, M.E.; Sánchez-Estrada, A.; Robles-Burgueño, M.R. y Troncoso-Rojas, R. (2006). Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternata* infection in tomato fruit. *J. Phytopathol.* 154, 236–244.
- Rupp, W.D. (1996). DNA repair mechanisms. En: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology", 2ª edición (F.C. Neidhart, ed.). American Society for Microbiology Press. Washington, D.C. 2277-2294.
- Sakihama, Y.; Cohen, M. F.; Grace, S. C. y Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicol.* 177, 67-80.
- Sala, J. y Lafuente M. (1999). Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid fortune mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 410-2414.
- Scandalios, J.G.; Tong, W.F. Y Roupakias, D.G. (1980). *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular location and some biochemical properties. *Molec. General Genetics.* 179, 33-41.
- Scebba, I.; Arduini, F.; Ercoli, L. y Sebastiani, L. (2006). Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. *Biol. Plant.* 50, 688-692.
- Schantz, M.L.; Schreiber, H.; Guillemaut, P. y Schantz, R. (1995). Changes in ascorbate peroxidase activities during fruit ripening in *Capsicum annum*. *BEBS Letters.* 258, 149-152
- 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.
- Sharma, P. K.; Anand, P.; Sankhalkar, S. y Shety, R. (1998). Photochemical and biochemical changes in wheat seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Sci.* 132, 21-30.
- Shi, Q.; Zhu, Z.; Xu, M.; Qian, Q. y Yu, J. (2006). Effect of excess of manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities. *Env. Exp. Bot.* 58, 197-205.
- Shigeoka, S.; Ishikawa, T.; Tamoi, M.; Miyagawa, Y.; Takeda, T.; Yabuta, Y. y Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53, 1305-1319.
- Shin, Y.; Hai Liu, R.; Nock, J.F.; Holliday, D. y Watkins, C. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biol. Technol* 45, 349–357.

- Sies H. (1985). *Oxidative Stress*. San Diego: Academic Press.
- Silva, E.M.; Souza, J.N.S.; Rogez, H.; Rees, J.F. y Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*. 101 (3), 1012-1018.
- Singleton, V.L. y Rossi, Jr. J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229–235.
- Smirnoff, N., y Wheeler, G.L. (2000). Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 291-314.
- Takahama, U. y Oniki, T. (1997). A peroxide/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiol. Plant.* 101, 845–852.
- Tatsumi, Y.; Isogai, M.; Sei, S. y Srilaong, V. (2006). Changes in ascorbic acid content and ascorbate metabolism-related enzyme activities during storage in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and balsam pear (*Momordica charantia* L.). *Acta Horticulturae*. 712, 755-761
- Teppa, M.; Kebat, C.; Velilla, S.; Ricetti, A. y Bifaretti, A.. (1994). Boletín Hortícola (Argentina). Año 2(3) p.1-12
- Thongsook, T. y Barrett, D. M. (2005). Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3206-3214.
- Tsuyoshi, S.; Nakano T. y Yokoi Y. (2006). Altitudinal changes in Rubisco and APX activities in *Aconogonum weyrichii* in the alpine region of Mt. Fuji. *Polar Biosci.* 19, 115-120.
- USDA (2007). National Agricultural Library. National Nutrient Database for Standard Reference. Consultado el 15 de octubre del 2007. [en línea].
http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_serach.pl?pepper
- Vicente, A.; Pineda, C.; Lemoine, L.; Civello, P.; Martínez, G.; Chaves, A. (2005). UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 69-79.
- Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R. y Civello, P.M. (2006). Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage, *Postharvest Biology Technol* 40, 116–122.
- Viña, S.Z. y Chaves, A.R. (2006). Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. *Food Chem.* 94, 68–74.

- Wang, C.Y. (1994). Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.* 4, 65-73.
- Wang, C.Y. (2000). Postharvest techniques for reducing low temperature injury in chilling-sensitive commodities. En: *Improving Postharvest Technologies for Fruits, Vegetables and Ornamentals*. Edit. Intern. Institute of Refrigeration. Eds; Artés, Gil y conesa. II: pp. 367-473.
- Wikipedia (2007), Consultado el 15 de octubre de 2007. Artículo: Capsicum. [en línea]. <http://es.wikipedia.org/wiki/Capsicum.htm>
- Wikipedia (2008), Consultado el 20 de febrero de 2008. Artículo: Radiación ultravioleta. [en línea]. <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Radiacionultravioleta.htm>
- Wills, R. B. H.; Wimalasiri, P. y Greenfield, H. (1984). Dehydroascorbic acid levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity. *J. Agric. Food Chem.* 32, 836-838.
- Wilson, J. (2002). The physiological role of dehydroascorbic acid, Minireview, *FEBS Lett.* 527, 5-9.
- Yue-Xuan W. y Von Tiedemann, A. (2002). Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environ.Pollution.* 116, 37-47.
- Zimmermann, P. y Zentgraf, U. (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 515-534.