

12
2ej



VERDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA SOBRE
LAS ALTERACIONES EN VEGETALES
PROVOCADAS POR SU EXPOSICION
A TEMPERATURAS BAJAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
Que para obtener el Título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A

ANA MARIA NEAVES FERNANDEZ

Dir. de Tesis: M. en C. Nidia Aragón Salgado



CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE.

	Página
1.- INTRODUCCION.	1
2.- OBJETIVOS.	7
3.- GENERALIDADES CONCEPTUALES.	8
4.- ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.	12
5.- COMPORTAMIENTO DE LA MITOCONDRIA VEGETAL ANTE LA BAJA TEMPERATURA.	16
5.1 Estrés.	17
5.2 Tolerancia.	23
5.3 Daño por frío.	36
6.- RESPUESTA PRIMARIA DEL DAÑO POR FRIO.	38
6.1 Alteración en la integridad de membrana.	39
6.2 La membrana como barrera física.	40
6.3 Modelos de la estructura de membrana.	57
7.- RESPUESTA SECUNDARIA DEL DAÑO POR FRIO.	68
7.1 Síntomas de daño por frío.	68
8.- RELACION ENTRE EL SINDROME DE ENFRIAMIENTO Y LA RESPIRACION.	79
8.1 Respiración acoplada.	79
8.1.1 Evaluación respiratoria.	81
8.1.1.1 Cociente respiratorio (CR).	83
9.- LA NATURALEZA DE LOS SUSTRATOS RESPIRATORIOS Y ALGUNOS EFECTOS POR TEMPERATURAS BAJAS.	89
9.1 Lípidos.	90
9.1.1 Contenido en frutos y hortalizas.	91
9.1.2 Variación del contenido lipídico.	91

9.1.3	Importancia.	95
9.1.4	Lipidos de reserva.	96
9.1.5	Lipidos estructurales.	104
9.1.6	Lipidos de proteccion.	110
9.1.7	Lipidos de contribucion sensorial.	114
9.2	Proteinas.	116
9.2.1	Contenido en frutos y hortalizas.	117
9.2.2	Variacion del contenido proteico.	120
9.2.3	Importancia.	125
9.2.3.1	Q ₁₀ .	127
9.2.4	Proteinas de reserva.	133
9.2.5	Proteinas estructurales.	134
9.2.6	Proteinas regulatorias.	134
9.3	Carbohidratos.	137
9.3.1	Contenido en frutos y hortalizas.	138
9.3.2	Variacion del contenido de carbohidratos.	140
9.3.3	Importancia.	141
9.3.4	Carbohidratos de reserva.	142
9.3.5	Carbohidratos estructurales.	143
9.3.6	Carbohidratos de contribucion sensorial.	147
10.	VIAS OXIDATIVAS DE LOS SUSTRATOS RESPIRATORIOS.	150
10.1	Lipidos.	150
10.2	Proteinas.	156
10.3	Carbohidratos.	159
10.3.1	Ruta Hexosa monofosfato (Ciclo de las Pentosas).	160

10.3.2 Ruta Emden-Meyerhof-Parnas (Glucolisis) .	183
10.3.2.1 Control.	180
10.4 Ciclo de Krebs (Ciclo de los acidos tricarboxilicos).	183
10.4.1 Control.	198
10.5 Sistema de transporte de electrones.	201
10.5.1 Ruta convencional.	202
10.5.2 Ruta alternante.	206
10.5.3 Inhibidores.	216
10.5.4 Determinacion del flujo de electrones a traves de las rutas convencional y alternante.	218
10.5.5 Eficiencia fosforilativa.	221
10.5.6 Factores acoplantes.	223
10.6 Hipotesis sobre el acoplamiento entre el sistema de electrones y la fosforilacion oxidativa.	224
11.- POSIBLE MECANISMO DEL DAÑO POR FRIO.	228
12.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA INCIDENCIA DEL DAÑO POR FRIO.	234
13.- TECNICAS PARA AMINORAR O EVITAR EL DAÑO POR FRIO.	295
14.- BIBLIOGRAFIA.	312

INDICE DE TABLAS.

Página

5.1.1 Composición de ácidos grasos de mitocondrias sensibles y resistentes al enfriamiento.	27
5.2.1 Influencia de las temperaturas intermitentes en la composición de ácidos grasos de lípidos polares en tejidos enfriados de pepino y pimiento morrón.	34
7.1.1 Síntomas visuales en frutas y hortalizas provocados por el daño por frío.	71
9.1.2.1 Contenidos de lípido y agua en pericarpos de algunas variedades de aguacate.	92
9.1.4.1 Composición y propiedades de algunos lípidos contenidos en especies vegetales.	97
9.1.4.2 Composición de ácidos grasos de aceites de oliva de diferentes países.	99
9.1.5.1 Composición de lípidos del tejido de manzana.	108
9.2.1.1 Contenido de proteína en frutos expresado como nitrógeno total x 6.25.	119
9.2.1.2 Contenido de proteína en cereales.	120
9.2.2.1 Factores utilizados en el análisis químico para determinar el contenido de proteína en cereales, granos y semillas.	122
9.3.1.1 Composición aproximada de carbohidratos de algunos productos hortofrutícolas.	139
12.1 Datos para almacenaje de frutos y hortalizas.	238

12.2 Comportamiento de las variedades de pepino crecidas en invernadero ante la baja temperatura.	239
12.3 Comportamiento de las variedades de pepino crecidas en el campo al ser transferidas de 5 a 12.5 °C.	240
12.4 Condiciones de almacenamiento recomendadas para algunas variedades.	241
12.5 Condiciones de almacenamiento para algunos frutos en función de su estado de desarrollo.	250
12.6 Relación entre el déficit de presión del vapor la temperatura y humedad relativa.	271
13.1 Condiciones experimentales en AC para evitar el daño por frío en frutos o hortalizas.	306

INDICE DE DIAGRAMAS.

	Pagina
1. Estructura de la mitocondria.	14
2. Representacion esquematica del efecto de la baja temperatura en las mitocondrias de tejidos vegetales.	18
3. Modelo de Danielli y Davson (1935).	60
4. Modelo de Robertson (1960).	61
5. Interpretaciones de la estructura de membrana por Korn (1968) y Staehelin y Frohne (1970).	63
6. Conversion de energia quimica a energia utilizable y calor a traves de la respiracion acoplada.	80
7. Rutas metabolicas de los diversos sustratos respiratorios.	151
8. Relaciones entre los intermediarios del metabolismo respiratorio y otras secuencias metabolicas.	152
9. Ciclo de la oxidacion de los acidos grasos (β oxidacion).	154
10. Ruta oxidativa de aminoacidos.	158
11. Ruta hexosa monofosfato (HMF) o ciclo de las pentosas.	161
12. Ruta Embden-Meyerhof-Parnas (Glucolisis).	165
13. Via de fermentacion.	178
14. Conversion de piruvato a acetil CoA.	186

15. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs.	189
16. Ciclo del glucoato.	191
17. Sistema de transporte de electrones a través de las rutas convencional y alternante.	203
18. Regulación del sistema de transporte de electrones mediante la oxidación de ácidos grasos.	212
19. Hipótesis sobre el acoplamiento entre el sistema de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.	227
20. Posible mecanismo del daño por frío en frutos u hortalizas.	233

INDICE DE GRAFICAS.

	Pagina
1. Flexibilidad de las membranas mitocondriales de vegetales sensibles y resistentes al enfriamiento.	22
2. Cambios diarios de la velocidad respiratoria de pepinos maduros e inmaduros después de un tratamiento osmótico.	28
3. Cantidades de Putrescina contenidas en flavedo y jugo de toronja después de 50 días y en pericarpio de pimiento después de 21 días a temperaturas de enfriamiento y óptimo almacenamiento.	30
4. Relación entre el índice de daño por frío y la concentración de Putrescina en flavedo de limón después de 21 días a temperatura de enfriamiento a 1 °C.	32
5. Salida de electrolitos del mesocarpio de pepinos almacenados a 4 o 14 °C.	53
6. Salida de electrolitos del mesocarpio de pepinos almacenados por 3, 7, 10, 14 y 18 días a 4 °C y transferidos a 14 °C.	54
7. Determinación visual de daño por frío en pepinos c.v. Hybrid C.	55
8. Variación de la composición de ácidos grasos en frutos de mango durante su almacenamiento a diferentes temperaturas.	103

9.	Efecto de la temperatura en el patron respiratorio de frutos de pera.	128
10.	Patron respiratorio de frutos durante sus fases de crecimiento y desarrollo.	249
11.	Vida de almacenamiento de pepinos variedad " Ohio M.R. 200 " a diferentes temperaturas.	256
12.	Relación entre el periodo de almacenamiento y temperatura de pepinos transferidos a 20 °C.	258
13.	Variación de la vida de almacenamiento de pepinos " Ohio M.R. 200 " de acuerdo a la fecha de cosecha.	261
14.	Efecto del enfriamiento a 7 °C por 7 días, con subsecuente maduración a 20 °C, en tomates cosechados a diferentes horas durante un día soleado.	264
15.	Efecto del enfriamiento a 7 °C por 7 días, con subsecuente maduración a 20 °C, en tomates cosechados a diferentes horas durante un día frío y nublado.	266
16.	Influencia de la temperatura del tomate en la sensibilidad al enfriamiento.	267
17.	Pérdida de peso de la calabaza " Dixie " durante su almacenamiento a 2 y 15 °C.	272
18.	Pérdida de peso de la calabaza " Dixie " después de 2 días a 15 °C.	272

19. Perdida de peso de manzanas c.v. Golden
Delicious. a diversas temperaturas y
humedades relativas. 272
20. Cierre estomático relativo de espinacas
sujetas a 15 y 5 °C. 275

1. INTRODUCCION.

El método de almacenamiento refrigerado, como alternativa para prolongar la vida útil de frutos y hortalizas, ha sido utilizado favorablemente, puesto que se aprovecha su efecto retardador del metabolismo, en consecuencia los procesos inherentes de maduración y senescencia e incluso la producción de calor.

Su uso provee un sin número de beneficios, se ejerce control del ataque por hongos poscosecha, por ejemplo del Rhizopus, así como el control de insectos nocivos tales como las moscas de la fruta (Ceratitis, Dacus, Anastrepha).

Por otra parte, algunas alteraciones en los productos hortofrutícolas son inducidas por la temperatura de enfriamiento, pero no necesariamente son del todo indeseables, sino por el contrario, cuando ha sido adecuado el tratamiento, proporcionan un mejor resultado en el desarrollo de sabor y textura en camotes almacenados, beneficia la maduración de peras y en naranjas se ha observado que cuando son enfriadas en la obscuridad desarrollan la coloración.

No obstante, la aplicación de la refrigeración está limitada severamente por el " daño por frío ", alteración fisiológica que ocurre cuando los vegetales son sujetos a temperaturas por abajo de aproximadamente 12.5 °C, pero por arriba de la temperatura de congelación de los tejidos.

Este daño aqueja a un innumerable si: no es que a todos los frutos, hortalizas, ornamentales, brotes y semillas germinando, en todos los estados de su desarrollo, excepto en el estado de semilla seca, cuando éstos son sometidos a estres por baja temperatura.

Inicialmente se considero que dicho trastorno fisiológico estaba restringido a las especies que proceden de zona cálida, es decir, las de origen tropical y subtropical, como por ejemplo: aguacate, plátano, piña, mango, papaya, toronja, lima, pepino, tomate, etc., estableciendose como corolario: " Un vegetal que no es de origen tropical o subtropical no es sensible al enfriamiento ". Sin embargo, no escapan a ello, las especies de origen templado, tales como: manzana, durazno, nectarina, ciruela, esparrago, papa, etc.. Es probable que las papas puedan ser consideradas de origen subtropical pero puesto que son originarias de altitudes altas se incluyen aqui.

El hecho de que las cosechas de origen templado no sean tan sensibles al enfriamiento como las cosechas de origen tropical o subtropical, puede ser debida a una distincion evolucionaria en donde las cosechas de origen templado han desarrollado mecanismos de supervivencia, para evitar ese riesgo genetico, por lo que poseen resistencia para sobrevivir al medio de enfriamiento. La diferencia en susceptibilidad al enfriamiento dada por su origen sugiere que puedan estar condicionadas no tan sólo geneticamente sino tambien por las condiciones del medio, porque estas últimas

Juegan un papel en la aparición de los daños por frío.

Permanecen en tela de juicio muchas interrogantes tanto en las causas como en el mecanismo básico que son las razones de los daños observados, por lo que surgen algunas desavenencias en la estimación en cuanto a que si el tipo de daño de los vegetales de origen templado es estrictamente comparable con el daño clásico exhibido por los de origen tropical o subtropical.

El daño por frío puede ocurrir durante el transporte, o bien, en el almacenamiento, distribución al mayoreo, tiendas de menudeo e incluso hasta en el refrigerador de la casa. Por ende, concierne a todos los eslabones de la cadena, desde el agricultor hasta el consumidor, reconocer y entender tal deterioro por baja temperatura, ya que influye en el incremento de las pérdidas, costo de producción y abasto a las crecientes poblaciones urbanas.

De ahí que el desorden por enfriamiento sea un importante e interesante tópico de investigación.

Ya desde hace años se conoce que ciertos vegetales no toleran las bajas temperaturas, no obstante, el interés general en investigación en la cuestión del daño por frío se dá durante los pasados 40 años poco más o menos y varios de esos estudios son tomados en cuenta después de 20 a 25 años. Sin embargo, la información a este respecto se encuentra dispersa en diversas fuentes. El tema aparece en algunos libros de fisiología vegetal aproximadamente en los años 70's pero el enfoque es muy variado,

al parecer los investigadores aun no unifican sus criterios quedando muchas veces ambiguas interpretaciones, quizás los diferentes resultados se deban a los desiguales métodos de evaluación, cultivares, condiciones de crecimiento, estados de desarrollo, métodos de manejo, variación estacional y condiciones poscosecha, entre otros. Debido a ésto el daño por frio rara vez puede ser replicado exactamente.

Además, el gran numero de investigaciones en torno a las alteraciones fisiológicas y bioquímicas, han sido encaminadas para dilucidar el posible mecanismo de daño por frio y llegar a su control, pero hasta la fecha, la información química, no identifica una reaccion principal, ni una ruta para vegetales sometidos a enfriamiento.

Por otra parte, partiendo de que se conoce la existencia de la variación genética en relación a la sensibilidad al enfriamiento en algunas especies de origen tropical, abre la posibilidad de aprovechar o explotar las causas de la resistencia al daño por frio para la ampliación o desarrollo de la tolerancia de las cosechas a la baja temperatura, lo cual toma una significancia adicional en la expansión de la producción dentro de zonas limitadas por el medio, así como consideraciones de tipo energético y de alimentación general.

Por estas razones y al creciente interés por competir con el mercado internacional sera el motivo para adoptar, adaptar y desarrollar tecnologías en torno al control por temperatura en un

digno esfuerzo por el mejoramiento de la calidad del producto. De tal suerte que la investigación sobre el efecto en los vegetales provocado por su exposición a baja temperatura será prioritaria.

En virtud de lo anterior, en el presente trabajo se realiza la investigación bibliográfica sobre las alteraciones en vegetales provocadas por su exposición a temperaturas bajas, basado en los diferentes puntos de vista de acuerdo a los resultados obtenidos de las diversas investigaciones disponibles.

Así mismo, éste estudio está orientado al efecto del daño por frío en la actividad respiratoria de vegetales, porque la oxidación biológica en frutos y hortalizas cobra gran importancia por su relación con los estudios de cambios en calidad, trastornos fisiológicos, vida de almacenamiento, maduración, manejo de los productos y muchos de los tratamientos poscosecha durante la comercialización. Por lo tanto, debe enfatizarse más sobre los mencionados aspectos ya que no han sido suficientemente cubiertos en la literatura.

En forma inicial, se plantea brevemente consideraciones de índole metabólico, con la finalidad de ubicar el proceso respiratorio. Posteriormente, dado que varios investigadores proponen que el inmediato y directo responsable a temperaturas por abajo de la temperatura crítica para suscitarse el daño, es una fase de cambio en la membrana mitocondrial que repercute en el metabolismo, se expone en términos generales, la actividad mitocondrial y el efecto de las bajas temperaturas, seguido de

los síntomas comúnmente apreciados como respuesta secundaria al daño por frío.

De esta manera se tratará el proceso metabólico, procediendo a la revisión de la naturaleza de los sustratos utilizados en la respiración con sus respectivas rutas metabólicas oxidativas y algunos efectos ocasionados por el frío. Todo ello para proponer un posible mecanismo del daño por frío.

Desde luego, no tendría sentido dar a conocer el problema desde su posible origen, sin que prácticamente no se hiciera nada por remediarlo, en consecuencia se examinarán los factores que influyen en la incidencia del daño por frío. Sugiriendo finalmente técnicas para aminorar o evitarlo.

Todo esto con el propósito de que este material sirva de apoyo en la propuesta de esquemas sujetos a investigación, a las condiciones que prevalecen en los productos hortofrutícolas Nacionales.

2. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Integrar la información sobre las alteraciones en vegetales provocadas por su exposición a temperaturas bajas, los factores que influyen en su incidencia así como los posibles técnicas para aminsonar o evitar las mismas, con el propósito de servir de apoyo en la propuesta de esquemas sujetos a investigación, a las condiciones que prevalecen en productos Nacionales.

Objetivos particulares:

- Proponer el posible mecanismo de daño por frío en frutos y hortalizas en base a los resultados de las investigaciones disponibles.

- Relacionar el síndrome de enfriamiento, como respuesta de los vegetales al daño por frío, con la actividad respiratoria.

- Integrar la información concerniente al efecto de la temperatura de enfriamiento en la naturaleza y procesos catabólicos de los diversos sustratos respiratorios.

- Revisar los factores que influyen en la incidencia del daño por frío en frutos y hortalizas.

- Señalar las posibles técnicas para aminsonar o evitar el daño por frío en los productos hortofrutícolas.

3. GÉNERALIDADES CONCEPTUALES.

Se conoce como metabolismo al conjunto de transformaciones de la materia efectuadas en la célula que comprende dos fases:

- Anabolismo.- Caracterizado por la síntesis (fenómenos de elaboración) por medio de los cuales se requiere de energía, se restablece y aumenta el potencial químico de la célula. El potencial químico es la energía libre o energía disponible, sin cambio de temperatura, para realizar trabajo por mol de sustancia, o sea, el potencial químico determina la energía con la cual reaccionará o se moverá una sustancia.

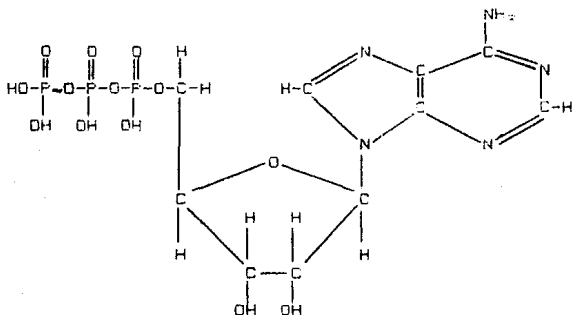
- Catabolismo.- Representado por las reacciones degradativas, fundamentalmente son fenómenos de oxidación en donde se libera energía, disminuyendo el potencial químico de la célula. (145, 147, 151, 157)

Dentro de esta última fase queda comprendida la respiración.

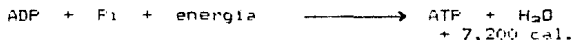
La respiración consiste en una sucesión de reacciones enzimáticas que permiten la degradación de moléculas de sustancias orgánicas hasta CO_2 y H_2O . En cada una de estas reacciones, en las que intervienen enzimas específicas, se transfieren electrones de la molécula combustible original que va a degradarse u oxidarse, a una serie de moléculas acopladas que conforman la llamada cadena de transporte de electrones, en las que cada molécula se va reduciendo en la medida en que acepta electrones y oxidándose al pasarlos, hasta que finalmente los

electrones son transferidos al oxígeno con formación de agua. (145, 151, 157)

Durante la transferencia se pierde energía, pero una parte de la energía liberada se conserva para la síntesis de nuevos enlaces denominados enlaces de alta energía, que van a dirigir otras reacciones. Uno de los más importantes es el enlace anhídrido fosfato-fosfato en la molécula de trifosfato de adenosina (ATP), cuya estructura es la siguiente: (145)

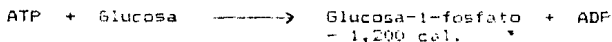


El trifosfato de adenosina (ATP) se forma a partir de difosfato de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) en la reacción endergónica:



La molécula de ATP almacena la energía del flujo de electrones como enlace fosfato o enlace de alta energía (escrita

normalmente con el signo ω , ver la estructura citada). Se puede conservar la energía en un enlace anhídrido y transferirla a otra molécula, sin la intervención del agua, con solo transferir el grupo, por ejemplo en la reacción:



en donde se transfiere el grupo fosfato y el éster de la glucosa-1-fosfato es el que ahora tiene la mayor parte de la energía del enlace del ATP . (145)

Por eso mismo, se considera al ATP como el más importante acarreador fosfato y constituye así, un versátil conductor de energía que puede transmitirla de un proceso a otro por la transferencia de grupos fosfato, catalizados por un grupo de enzimas conocidas como cinasas (157). Aunque contrariamente existen otras enzimas, importantes en el principio de conservación de energía, la fosfatasa (que hidroliza los fosfatos) y ATPasa (que ataca al ATP), que hidrolizan los enlaces de alta energía directamente, para forzar que las reacciones se presenten. Así que, la energía de hidrólisis de un enlace de alta energía puede utilizarse para efectuar una reacción, a pesar de la alta concentración del producto. Ambas enzimas, son secretadas en compartimientos celulares y solamente se liberan cuando se requieren. (145)

Por otro lado, la energía almacenada en la molécula del ATP es empleada en las diversas reacciones de síntesis de la célula

(por ejemplo, a través de estados intermediarios, la hidrólisis del ATP y de Glucosa-1-fosfato se acopla a la síntesis de la sacarosa), entonces el ATP también actúa como mecanismo de regulación y control esencial para el mantenimiento y balance de todas las actividades metabólicas de los organismos.

(145, 151, 157, 141)

Hasta el momento, a grosso modo se ha revisado el principio del mecanismo respiratorio, al punto que puede advertirse lo difícil que resulta comprender el metabolismo, porque no se sabe con precisión en qué instante se efectúan las reacciones de síntesis y en cual, las reacciones degradativas; probablemente bajo ciertas condiciones se ejecuten en forma simultánea, dado que ambas están asociadas con la producción, transformación y utilización de la energía, menester indispensable para llevar a cabo las actividades metabólicas. En consecuencia, el planteamiento posterior no incurre en las reacciones de síntesis, solo se abordan las reacciones y sus efectos por bajas temperaturas del proceso degradativo en productos vegetales.

4. ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.

A las mitocondrias o condriosomas se les suele aludir como las "centrales energéticas" de la célula, debido a que generan la energía mediante la ruptura controlada de sustratos respiratorios para la síntesis de gran parte del ATP. Como se había mencionado, la energía almacenada en la molécula de ATP puede ser cedida y utilizada con gran facilidad para activar las reacciones celulares que consumen energía.

Las mitocondrias al contener DNA (ácido desoxirribonucleico) les confiere cierto grado de autonomía. Se sugiere que el DNA mitocondrial puede estar solamente relacionado con la síntesis de ciertas proteínas (quizás estructurales) y que la mayoría de las proteínas enzimáticas posiblemente están programadas por el DNA nuclear (12, 13). Como no se ha realizado un profundo estudio en vegetales maduros y senescentes, podría ser tema para futuras investigaciones.

Además, las mitocondrias realizan otras funciones no respiratorias, tales como el transporte de iones, transhidrogenación, bombeo de agua, oxidación de lípidos y síntesis de un gran número de metabolitos. (14).

El campo de estudio de la estructura de las mitocondrias ha tenido una importancia básica. Son corpusculos pleomórficos generalmente ovales (alrededor de $4 - 7\mu$ de largo y $0.5 - 1\mu$ de diámetro), limitadas por una doble membrana. La membrana interna

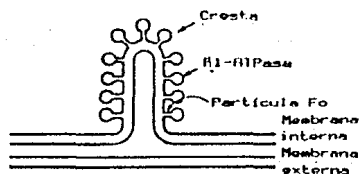
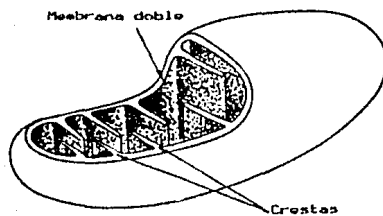
presenta repliegues hacia el interior llamadas crestas, que parecen tener pequeñas protuberancias cerca de 70 Å de diámetro denominadas F₁-ATPasa, adheridas a su superficie interna por pedúnculos de 30 Å de largo aproximadamente, llamados partículas F₀. (145, 151, 157) (Ver diagrama 1)

En su interior ocurren los principales procesos bioquímicos; el ciclo de Krebs (conocido también como ciclo de los ácidos tricarbóxicos TCA o ciclo del ácido cítrico) en la matriz mitocondrial y la cadena o sistema de transporte electrónico concomitante a la fosforilación oxidativa acoplada del ADP, en crestas y membrana interna. En lo que respecta a las enzimas que participan en dichos procesos, las deshidrogenasas al parecer están distribuidas dentro de la matriz mitocondrial, con excepción de la deshidrogenasa succínica que se encuentra en la membrana interna, mientras que las oxidasas citocromicas se encuentran adheridas a las membranas y crestas. Esto aparentemente resulta lógico debido a la necesidad de liberar CO₂ fuera de las mitocondrias. (157, 141)

Cabe hacer notar que además en la mitocondria existen un gran número de enzimas que toman parte en las reacciones involucradas con el sabor, tal como las transaminasas en los tomates, las tioglucosidasas en la col y la C-S liasa de las cebollas. (114, 143)

Durante el desarrollo de los vegetales las mitocondrias sufren cambios. En células meristemáticas es decir, en tejido

DIAGRAMA 1 Estructura de la mitocondria.



joven en el que las células todavía se multiplican por división. las mitocondrias contienen pocas crestas y la respiración es parcialmente fermentativa. Durante el crecimiento y diferenciación, aumentan las crestas junto con los contenidos de enzimas participantes en el ciclo de Krebs y en la transferencia de electrones, presentándose en gran número en células metabólicamente activas. La relativa importancia de los distintos ciclos de oxidación (ciclo del glioxilato, ciclo de pentosa fosfato, ruta Embden-Meyerhof-Farnas, ciclo de Krebs) dan la impresión de cambiar en cada especie, en cada órgano y según la ontogenia de la planta. Parece que la oxidación a través de la ruta Embden-Meyerhof-Farnas (Glucólisis) y del ciclo de Krebs, son los principales trayectos, aunque en algunos casos la oxidación vía pentosa fosfato explique de manera aproximada, un tercio del catabolismo de la glucosa. (15)

En el tejido maduro, disminuyen las enzimas mitocondriales y la relativa importancia del ciclo de pentosas fosfato se incrementa, esto se sabe actúa en pepino, tomate, pimiento, lima, naranja y plátano.

Y finalmente, al llegar a la senescencia se reduce el número de mitocondrias intactas, baja la actividad mitocondrial, se dilatan las crestas y en determinados casos se desorganiza toda la estructura de la membrana. (10,15,23)

5. COMPORTAMIENTO DE LA MITOCONDRIA VEGETAL ANTE LA BAJA TEMPERATURA.

Después de la revisión básica de la mitocondria vegetal, se puede pasar a examinar su respuesta ante la baja temperatura.

En general, el desarrollo de los vegetales rara vez se realiza bajo condiciones adecuadas, debiendo responder a las provocaciones del medio tales como: las de carácter climatológico (sequía, calor, frío, helada), ubicación geográfica o física de las plantas y su proximidad entre unas y otras (sombra, luz solar, deficiencias o excesos en el suelo de minerales y agua, altitud), lesiones, déficit de vapor de agua, falta de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, exposición a radiaciones ionizantes, contaminación atmosférica, efectos de lavado por precipitación excesiva, etc. (143, 121)

Las reacciones de los tejidos vegetales a las mencionadas condiciones son complejas e implican diversas respuestas fisiológicas, desde respuestas directas bioquímicas a través de acciones hormonales hasta efectos hereditarios (145). Aunque normalmente van encaminadas hacia la protección: previniendo la pérdida de agua, desarrollando barreras físicas y químicas en presencia de agentes patógenos o adaptándose a condiciones extremas de temperatura. (153)

Cuando los frutos y hortalizas no pueden adaptarse a la situación, guía al daño o hasta la muerte celular.

En particular, las diversas respuestas que generan las mitocondrias de tejidos de plantas por efecto de la baja temperatura (intervalo de 0 a 12.5 °C aproximadamente), pueden observarse en el diagrama 2.

Dependiendo del tipo de esfuerzo al que es sometida la mitocondria puede mostrarse bajo:

- I. Estrés.
- II. Tolerancia.
- III. Daño por frío.

5.1 Estrés.

La mitocondria se estresa si es expuesta corto tiempo a baja temperatura y muestra una reacción elástica, ésto es, una vez que cesa la tensión puede volver a su situación inicial.

Durante este estado ocurre:

- Desorganización de la estructura celular y subcelular.
- Suspensión del flujo protoplasmático.
- Incremento en la viscosidad protoplasmática.
- Pérdida de la permeabilidad celular y liberación de solutos.
- Pérdida de compartimentación ; definida como una restricción al movimiento de cada enzima o sustrato debida a los elementos estructurales de la célula.

Desorganización de la estructura celular y subcelular.
 Cesación del flujo protoplásmico.
 Incremento en la viscosidad protoplásmica.
 Pérdida de la permeabilidad celular y liberación de solutos.
 Reducción de la fotosíntesis.
 Estimulación de la producción de etileno.

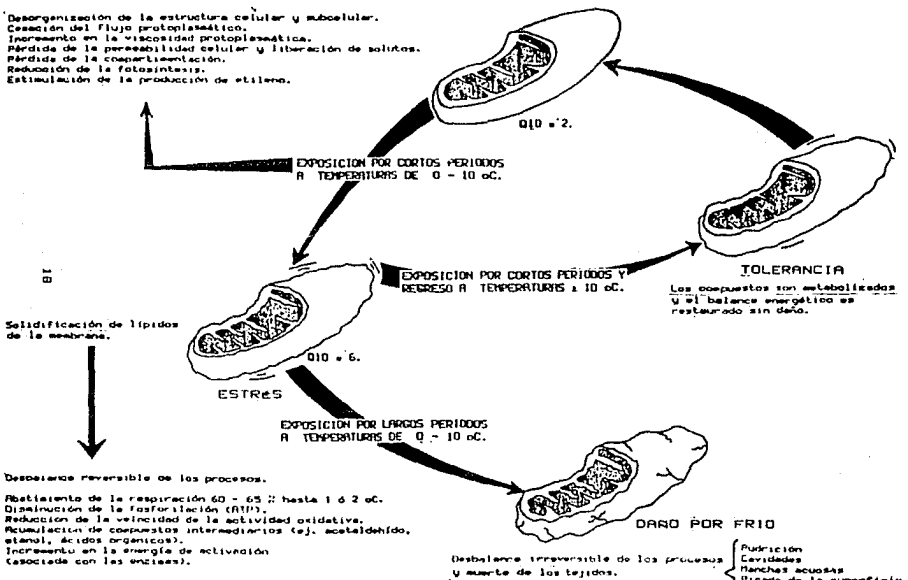


DIAGRAMA 2 Representación esquemática del efecto de la baja temperatura en las mitocondrias de tejidos vegetales.

FUENTE: Descripción realizada por Ana María Neves Fernández.

- Reducción de la fotosíntesis.
- Estimulación de la producción de etileno.

(1, 14, 29, 30, 31, 32, 34, 44, 47, 70, 71, 72, 104, 131, 132, 133, 134, 141)

Mientras que la mitocondria padece una transición de su estructura liquido-cristalina a una estructura solido-gel, lo cual origina un desbalance reversible de los procesos que en su interior se efectúan y en consecuencia resulta:

- Abatimiento de la respiración en un 50-65 % hasta 1 ó 2°C, dependiendo de la especie.
- Disminución de fosforilación oxidativa (ATP) es decir, baja el abastecimiento y utilización de la energía.
- Reducción de la velocidad de la actividad oxidativa.
- Acumulación de compuestos intermedarios (ej. etanol acetaldehído, ácidos orgánicos).
- Incremento en la energía de activación (asociada con las enzimas).

(3, 14, 19, 23, 29, 37, 44, 47, 70, 71, 72, 81, 84, 104, 119, 128, 141, 143)

Todos éstos aspectos con más detalle son revisados durante la secuencia explicativa de los procesos bioquímicos efectuados en mitocondria.

Ahora, aún cuando se ha acordado generalmente, que la primera respuesta de las especies vegetales a la tensión por frío, es ese cambio físico de las membranas mitocondriales, existen controversias en definir si el único factor que

determina la fase de transición, fluidez de la membrana y sensibilidad al enfriamiento, sea la composición de lípidos. (14, 18, 20, 71, 131, 134)

Se ha atribuido a la procedencia de las especies la susceptibilidad al daño cuando son expuestas a temperaturas abajo de los 12.5 °C aproximadamente y superiores al punto de congelación de los tejidos. Así, las originarias de zonas tropicales y subtropicales como el aguacate, mango, plátano, papaya, uva, lima, tomate, camote, etc., son las más sensibles a la temperatura crítica; mientras que las especies resistentes provienen de zonas templadas y pueden ser expuestas por periodos prolongados durante el citado intervalo de temperatura, sin ningún daño por ejemplo la coliflor, nabo y chicharo. (14, 18, 20, 71, 131, 134, 141)

Dicha susceptibilidad ha sido correlacionada con estudios sobre el comportamiento y composición de la membrana mitocondrial.

Así, Lyons y colaboradores (1964) suponen que la susceptibilidad al enfriamiento podría estar relacionada con la flexibilidad de las membranas mitocondriales y que su diferencia estaría asociada con la proporción relativa de ácidos grasos saturados e insaturados de los lípidos de la membrana. Postularon y tratan de probar que existe una relación entre la flexibilidad de la membrana con el control de los procesos metabólicos y con el mecanismo del daño por frío. (20, 71, 72)

Para distinguir la flexibilidad de las membranas mitocondriales de vegetales, los autores evaluaron la respuesta a través de someterlas a cambios osmóticos y determinándolo mediante densidad óptica (absorbancia), en dos medios:

a) Medio hipertónico con sacarosa. En este, la concentración fuera de la mitocondria es menor, por lo que el agua tiende a salir del organelo provocando su contracción y detectándose una alta densidad óptica.

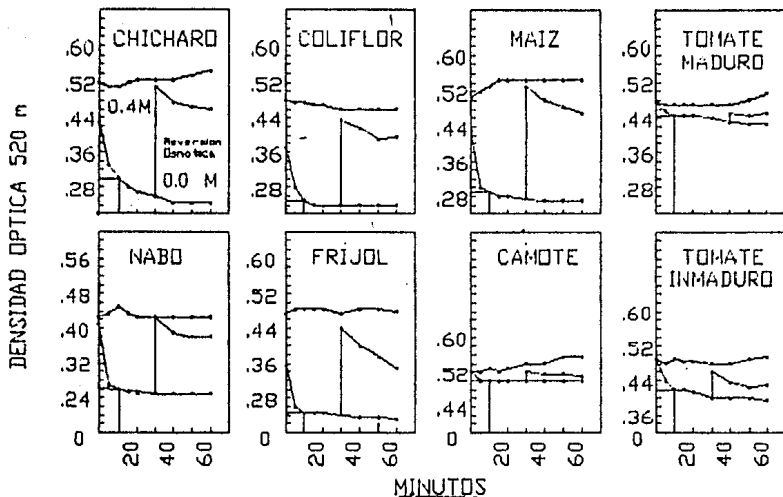
b) Medio hipotónico con Tris (solución amortiguadora). Resulta ser lo contrario del anterior, el agua tiende a entrar provocando el hinchamiento de la mitocondria con la consecuente baja densidad óptica.

Las gráficas 1 muestran los resultados obtenidos.

Como puede observarse en el medio hipotónico (línea inferior), comúnmente se tiene mayor densidad óptica en mitocondrias sensibles (brote de frijol, raíz de camote, brote de maíz y fruto de tomate), que en mitocondrias resistentes (brote de chícharo, brote de coliflor y raíz de nabo).

La mayor capacidad de hinchamiento o flexibilidad la denotan las mitocondrias resistentes debido a su composición de membrana, ya que estas presentan un mayor contenido de ácidos grasos insaturados (ácido linolénico $C_{18:3}$, ácido linoléico $C_{18:2}$) comparados con las mitocondrias sensibles.

GRAFICAS 1 Flexibilidad de las membranas mitocondriales de
vegetales sensibles y resistentes al enfriamiento.



FUENTE: Plant Physiol., 39: 262-268 (1964).

En la tabla 5.1.1 se expone en forma resumida los resultados mencionados.

TABLA 5.1.1 Composición de ácidos grasos de mitocondrias sensibles y resistentes al enfriamiento.

	RESISTENTES			SENSIBLES			
	COLIFLOR	NABO	CHICHARRO	FRÍJOL	CAJOTE	MAÍZ	TOMATE
TOTAL DEL % EN PESO DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS (C ₁₈ Y C ₁₈)	73.3	79.0	78.6	72.1	62.3	66.8	69.2
TOTAL DE % EN PESO DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS (C ₁₂ , C ₁₄ Y C ₁₆)	23.2	20.1	20.7	26.2	35.9	31.4	25.0
RELACION INSATURADOS/SATURADOS	3.2	3.9	3.8	2.8	1.7	2.1	2.8

Nota: Ácidos grasos insaturados: palmitoleico C_{17:1}, oleico C_{18:1}, linoleico C_{18:2}, linolénico C_{18:3}; Ácidos grasos saturados: laurico C_{12:0}, palmítico C_{16:0}, estearico C_{18:0}.

FUENTE: Plant Physiol. 39: 262-268 (1964).

Cabe hacer mención que los ácidos linoleico y linolénico son parte constitutiva de la membrana y son precursores en la síntesis del ácido araquidónico que se requiere para darle rigidez a la mitocondria (14), por lo que para estar de acuerdo con los resultados presentados es probable que a bajas temperaturas ocurra la síntesis en especies sensibles al enfriamiento, faltaría demostrarlo.

Más tarde, Lyons y Asmundson (1965) estudiando la relación entre la sensibilidad de los vegetales al enfriamiento y la solidificación de mezclas de ácidos insaturados/saturados, hallaron que una ligera diferencia en las cantidades de ácidos grasos insaturados en la mezcla podría tener un efecto marcado en

la solidificación y esta pudiera ser significativa para la determinación de la sensibilidad al enfriamiento dada por las especies vegetales. (134).

Por otra parte, en un estudio de las características físicas de mezclas de ácidos grasos puros, se observó que un incremento de solo 1 a 2 % de la cantidad de ácidos grasos insaturados (cantidad aproximada a la encontrada en mitocondrias vegetales), disminuye la temperatura de solidificación sobre los 15 °C (76); relacionándolo con las especies tropicales y subtropicales (las más sensibles al frío) quiere decir que sus ácidos grasos constituyentes de las membranas mitocondriales pueden solidificarse a temperaturas bajas, ocasionando anomalías metabólicas y cambios notorios en permeabilidad.

Todo esto conduce a Lyons a plantear la hipótesis: " La fase de cambio ocurre en la membrana de mitocondrias de plantas sensibles al frío y esta fase de cambio (estado líquido-cristalino al estado sólido-gel) determina la temperatura crítica bajo la cual el organismo no sobrevive ". (76).

No obstante, como inicialmente se indicó, en contraposición recientes informes indican que el grado de insaturación de los ácidos grasos podrían no estar necesariamente relacionados con el estado físico de la membrana y la sensibilidad al enfriamiento, puesto que en papa blanca (zona templada) dio una relación más baja de ácidos grasos insaturados que en el camote (zona tropical). Así como también en la soya (especie sensible al

frio) y chicharos (especie resistente al frio), los tipos de fosfolipidos y el grado de insaturación de sus respectivos acidos grasos fue muy similar a pesar de su vasta diferencia en sensibilidad. (134,141).

Entonces, se plantea que otros componentes de la membrana tales como esterol y colesterol o bien el complejo lipido-proteina podrian estar involucrados en la regulacion de la fluidez de la membrana (134). Una aportación interesante a este respecto es la de Kuiper (1985) donde menciona que los esteroles libres son caracteristicos del plasmalema o membrana celular responsables de regular la estabilidad lipidica, asi como de la variación en la permeabilidad de iones dependiendo del tipo de esterol debido a la estereoquímica de las moleculas (141). Esto último se explica con detalle en el punto 9.1.5.

Aún no hay nada decisivo. Falta investigar más sobre la función de dichos componentes de las membranas vegetales ante la exposición a bajas temperaturas.

Por otra parte, algunos cambios fundamentales asociados con el estrés por baja temperatura, parecen estar relacionados con cambios causados por otros tipos de estrés, los cuales podrian anticiparse y tener un efecto en el desarrollo del desorden fisiológico. A manera de ejemplo, Fukushima et. al (1977) lo demuestran en pepinos, al establecer una analogía entre el daño por estrés osmótico y el daño por frio, manejando dos cultivares Natsusairaku No. 2 y Tokuwatika 1 a los

tamaños diferentes, unos de 10 cm. (menos maduros) y otros de 20 cm. (maduros) y sujetándolos a estres osmotico con soluciones de NaCl en concentraciones de 0.15, 0.10, 0.075, 0.05 y 0 (H₂O) M.

Ellos observaron que cuando el periodo de enfriamiento se prolonga lo suficiente para causar daño por frio, los frutos sufren al mismo tiempo estrés por agua, debido a un déficit o exceso de la misma y sus membranas celulares se tornan rígidas.

Similar efecto sucede con los pepinos cuando son sujetos a estrés osmótico. Tal estrés aparece de un deficit o exceso de agua y el fruto menos maduro con membrana celular rígida sufre daño más severo que el fruto maduro con membrana celular flexible. El daño por estrés osmótico de frutos hidratados fue parecido al daño por frio de pepinos almacenados a 5°C, en tanto que el daño por estres de frutos menos maduros deshidratados fue parecido al daño de frutos enfriados a 0°C. El fruto maduro, de membrana flexible, no desarrolló daño por estres osmótico.

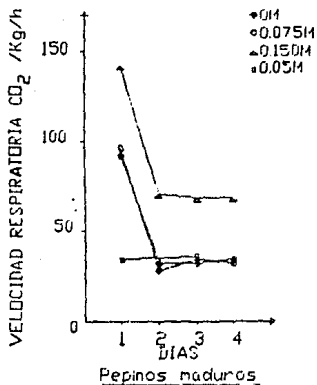
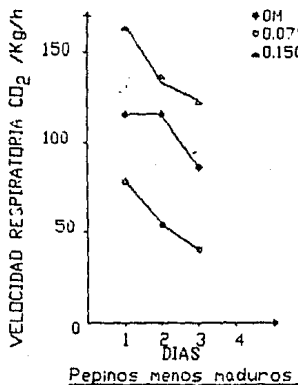
Existen de manera general, dos tipos distintos de sintomas de daño por frio en pepino, uno como un fino arrugamiento vertical y el otro un tipo de depresion u hondonada. El primero principalmente se observa en el fruto enfriado a 0°C y se da por una contraccion del protoplasma y superficies de organelos, mientras que el segundo aparece en frutos enfriados a 5°C ocurriendo un rompimiento de la membrana celular o plasmalema. La causa directa de esos dos daños podria depender de la interaccion

de las membranas celulares rígidas y al estrés por agua. Con la deshidratación se induce la contracción y la hidratación provoca rompimiento.

También tales cambios fueron relacionados con la respuesta respiratoria de los frutos después del tratamiento osmótico, como puede apreciarse en las gráficas 2, la de la izquierda correspondiente a pepinos menos maduros y la de la derecha a pepinos maduros.

En ambos casos, la velocidad respiratoria tuvo un incremento tremendo en el primer día después del tratamiento osmótico y fue independiente del estado fisiológico. Pero después, en frutos menos maduros, que por ciento fueron los que resultaron dañados, la velocidad permaneció elevada con tendencia a la baja, mientras que en los maduros descendió la velocidad respiratoria para permanecer casi constante, coincidiendo con los frutos que no fueron dañados. Esta evidencia podría sustentar la importancia de la rigidez de las membranas celulares para el comienzo del daño por frío. Además, en vista de que se registra el mismo comportamiento respiratorio en frutos menos maduros y maduros, bien podría reflejar que la estimulación inicial de la respiración es como respuesta de resistencia al estrés, más que una alteración metabólica debida al estrés. (23, 24, 25)

GRAFICAS 2 Cambios diarios de la velocidad respiratoria de pepinos maduros y no maduros despues de un tratamiento osmótico.



FUENTE: Scientia Horticulturae, 6: 303-304 (1977).

Ahora bien, existen ciertas sustancias que han sido vinculadas con varias condiciones de estrés, por citar algunas, entre ellas se hallan las poliaminas tales como: la espermidina, espermina (sintetizada a partir del acrilonitrilo y del 1,4-diaminobutano) y especialmente la putrescina (1,4-diaminobutano). (22,23,24)

Se ha encontrado acumulación de putrescina en brotes de cebada deficientes en potasio (Richards y Coleman, 1952); en chícharo, frijol, cebada y hojas de rábano, deficientes en magnesio (Basso y Smith, 1974); en hojas de frijol y avena tratadas con cadmio (Weinstein et. al, 1986); en plantas con un excesivo suministro de amonio (Smith, 1984) y sodio (Strogenov, 1974); en hojas de cereal cuando fueron expuestas a un shock osmótico (Flores y Galston, 1984) o sujetas a estrés por ácido (Young y Galston, 1983); por la fumigación de brotes de chícharo con dióxido de azufre (Friebe et. al, 1978); así como también se ha sugerido que la acumulación de putrescina podría ser la causa del daño inducido por estrés al enfriamiento.

(4.22.74.103)

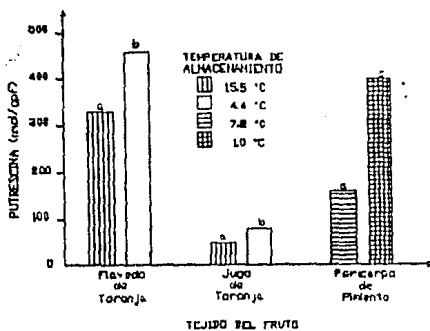
Así, McDonald y Kushad (1986) experimentando con flavedo de limón (Citrus limon (L.) Burm. f. cv. Bearss), flavedo y jugo de toronja (C. Paridisi Macf. cv. Marsh) y pericarpo de pimiento (Capaicum annuum L. cv. Early Calwonder) en estado comercial aceptable, observaron mayor acumulación de putrescina en tejidos enfriados que en aquellos que no lo fueron, como se muestra en la gráfica 3.

La putrescina se incrementó aproximadamente 2.5 veces más en pericarpo de pimiento almacenado a 1 °C comparado con el almacenado a 7.2 °C.

Hubo un incremento de la misma diamina de 68% en flavedo de limón, 39% en flavedo de toronja, 49% en jugo de toronja y 149%

en pericarpio de pimienta, cuando los frutos fueron almacenados a baja temperatura.

GRAFICA 3 Cantidades de Putrescina contenidas en flavedo y jugo de toronja después de 60 días y en pericarpio de pimienta después de 21 días a temperatura de enfriamiento y óptimo almacenamiento.



NOTA: Las letras arriba de cada una de las barras indican el índice de daño por frío: a = 1.0; b = 1.3 y c = 3.8.

FUENTE: Plant Physiol., 82: 324-326 (1986).

Las más grandes diferencias en los niveles de putrescina se hallaron en el pericarpio de pimienta (166 a 413 nanomoles por gramo de peso fresco) entre temperaturas de almacenamiento de 7.2 y 1 °C por 21 días, el cual resultó ser el fruto registrado

con daño por frío con mayor severidad.

La menor diferencia (338 a 470 nanomoles por gramo de peso fresco) se encontró en el flavedo de toronja entre las temperaturas de almacenamiento de 15.5 y 4.4 °C almacenados por 60 días.

Era de esperarse que al probar con dos porciones diferentes de tejido de toronja es decir, el jugo y el flavedo, el nivel de putrescina resultaría menor en donde no fuera visible el daño por frío. Sin embargo, en el jugo se registró una mayor diferencia, lo cual sugiere que el estrés por entriamiento influye en el incremento de putrescina en los tejidos de los frutos más sensibles al tratamiento.

Desde luego, habría que considerar en éstos resultados las condiciones del tiempo al que están siendo expuestos los frutos, así como el intervalo de la temperatura de enfriamiento, pero no puede negarse el incremento en la putrescina.

Por otro lado, en flavedo de limón después de 21 días a 1 °C, hubo una estrecha relación lineal entre la severidad del daño por frío y la cantidad de putrescina. Calculan un coeficiente de correlación entre ambas variables de 0.90, como se observa en la gráfica 4.

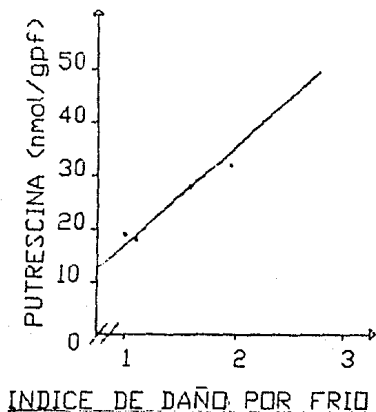
Claro, éste es muy relativo porque el índice de daño por frío es una determinación subjetiva.

En cambio, los niveles de espermidina y espermina determinados tanto en frutos sujetos a temperatura baja como los

mantenidos a temperatura ambiente, no hubo relación significativa, entre las dos poliaminas y el daño por frío. (42)

La acumulación de putrescina se cree que contribuye en el balance al haber un incremento de la concentración de aniones durante tales condiciones de estrés y además las poliaminas pueden estar implicadas en el mantenimiento de la termoestabilidad de la membrana. (43)

GRAFICA 4 Relación entre el índice de daño por frío y la concentración de Putrescina en flavedo de limón después de 21 días a temperatura de enfriamiento (1 °C).



FUENTE: Plant Physiol., 92: 324-326 (1986).

5.2 Tolerancia.

La mitocondria se vuelve tolerante cuando es expuesta por corto tiempo a baja temperatura y posteriormente mantenida a una temperatura igual o mayor de 10 °C, presentando la capacidad para soportar la tensión y sobrevivir. Esta respuesta puede dar lugar a un efecto condicionante y de fortalecimiento, al tornarse más resistente al esfuerzo luego de haberse expuesto a dosis subletales de tensión (14, 134, 145). Por ejemplo: los granos de trigo pueden sobrevivir a las bajas temperaturas invernales después de una exposición prolongada a temperaturas progresivamente bajas durante el otoño. (145).

Diversos estudios sustentan que las mitocondrias vegetales que responden a la inclemencia metabolizan los compuestos, restaurando el balance energético.

Wang y Baker, al trabajar con pepino (Cucumis sativus L. cv. Poinsett) y pimiento morrón (Capiscum annuum L. cv. Keystone Resistant Giant No. 3) almacenados por 5 o 7 días y 10-14 días respectivamente a 2.5 °C (según datos preliminares es la temperatura en la que se manifiestan los daños con mayor severidad), 90 - 95 % de humedad relativa y después transferidos a 20 °C por 24 hr. con temperaturas intermitentes en intervalos de 3 días. Encuentran que el grado de insaturación de los ácidos grasos de 18 carbonos tienden a incrementarse después de haberlos expuesto a 2.5 °C. (131).

La tabla 5.2.1 concentra los resultados.

Los mismos investigadores hallaron un comportamiento parecido en duraznos cuando los almacenaron a 0 °C con 1% O₂ y 5% CO₂ y trasladados intermitentemente a temperaturas elevadas: tuvieron una relación más alta de ácidos grasos insaturados/saturados y mucho menos oscurecimiento interno inducido por el frío que los duraznos almacenados a 0 °C en aire.

TABLA 5.2.1 Influencia de las temperaturas intermitentes en la composición de ácidos grasos de lípidos polares en tejidos enfriados de pepino y pimiento morrón.

TRATAMIENTO	CONTENIDO ACIDOS GRASOS (% PESO SECO)				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
PEPINO:					
CONTROL	3534.7	416.4	657.9	3997.2	8197.1
TRANSFERIDO	3471.8	407.1	716.7	5199.8	9472.1
PIMIENTO MORRON:					
CONTROL	783.5	266.1	85.7	1789.2	1102.4
TRANSFERIDO	990.4	322.9	161.5	2544.4	1883.4

Nota: El control de los pepinos fueron expuestos a 2.5 °C por 5 días y los pimientos por 10 días.

FUENTE: Plant & Cell Physiol., 20(2): 247-251, 1979.

Así, Miller y colaboradores observaron en mitocondrias de semillas de trigo un marcado incremento de insaturación total de lípidos en las germinadas a 2 °C comparadas con las crecidas a 25 °C.

Por otro lado, al estudiar la transferencia de plantas de

nabo silvestre bajo condiciones favorables de crecimiento (25 °C día y 20 °C noche) a 5 °C. se presentó un incremento en el contenido de ácido linoleico en las fracciones de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de las hojas.

Similares resultados obtuvieron, St. John J.B. y M.N. Christiansen (1976) en plantas de algodón; De la Roche I.A., E.J. Andrews, M.F. Pomeroy, F. Weinberg y M. Kates (1972) en semillas de trigo; Gerloff E.D., T. Richardson y M.A. Stahmann (1966) y Fuiper, P.J.C. (1970) en raíces y hojas de alfalfa y Ketchie, J.O. (1966) en duraznos.

De tal forma, St. John y Christiansen, usaron la relación $C_{18:1} / C_{18:2}$ como indicador a la sensibilidad al frío. Una relación baja podría indicar tolerancia al frío (21); sin embargo, esto no es claro para Wang y Baker, ya que la proporción de mejor correlación con el incremento observado en la resistencia al frío es, $C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3} / C_{18:0}$ (13).

Las dobles ligaduras han sido usadas también para indicar el grado de insaturación de los lípidos de la membrana (21), sin problema en los estudios de Wang y Baker (13), pero cuestionado por Dogras, C.C., D.R. Dilley y R.C. Herrer (22).

El incremento en las tres dobles ligaduras de ácidos grasos, sugieren Miller y colaboradores, permiten el acortamiento de la cadena de los hidrocarburos que se encuentran empaquetados ordenadamente en la región hidrofóbica de la bicapa de fosfolípidos lo que en consecuencia podría incrementar la fluidez

o flexibilidad de la membrana mitocondrial.

Pero aún, la razón del incremento en el grado de insaturación de los ácidos grasos es desconocido, probablemente se deba a que el estrés al enfriamiento induce un ajuste rápido del metabolismo.

Por lo que cada vez resulta más inobjetable y complicado el metabolismo vegetal, ya que durante las condiciones menos apropiadas responde con procesos de adaptación y aclimatación, originando una serie de modificaciones de ciertos elementos que colaboran en promover la resistencia. Pero por fortuna algunas no pasan desapercibidas por los investigadores y son aprovechadas como punto de partida en la búsqueda de condiciones que propicien dichas modificaciones para lograr aminorar o evitar el daño por frío. Varias de esas aportaciones se exponen en el último capítulo del presente estudio, pudiendo servir de referencia para guiar la investigación hacia nuevas direcciones.

5.3 Daño por frío.

La mitocondria sufre daño por frío, si se expone por un tiempo prolongado a baja temperatura o bien durante un período corto y la temperatura desciende más. Aquí entonces la reacción se denomina plástica es decir, el organelo se deforma e irreparablemente es dañado y muere.

Con frecuencia el término "daño por frío" es utilizado

para referirse al desorden fisiológico " per se ", al resultado de los síntomas. o ambos. (23, 141)

6. RESPUESTA PRIMARIA DEL DAÑO POR FRÍO.

Con el afán de explicar el posible mecanismo del daño por frío en productos vegetales, los investigadores han propuesto un sin fin de hipótesis y en el intento por aducir un testimonio fehaciente de lo afirmado, han tenido que incursionar en otras áreas del conocimiento que ni siquiera se sabía con entera certeza su participación dentro del esquema metabólico vegetal. Como es el caso, la determinación de la primera respuesta de los frutos y hortalizas al enfriamiento.

Por consentimiento unánime se ha establecido como respuesta inicial, la alteración en la composición estructural de la membrana y de ahí deriva el desbalance de los procesos que se llevan a cabo en su interior. Sin embargo, en estudios más recientes se considera que los cambios en la membrana podrían ser secundarios a otras alteraciones celulares.

Así lo indica Carter y Wick (1984), cuando un principal componente de la célula (citoesqueleto), los microtubulos, han mostrado despolimerización al ser expuestos a baja temperatura.

(11)

Los microtúbulos son estructuras subcelulares cuyo diámetro está alrededor de 200 - 300 Å, se encuentran dispuestos en forma muy apretada contra la interfase citoplasma-pared y están orientados paralelamente a las microfibrillas situadas en la pared celular. Presumiblemente están vinculadas a la síntesis de

pared celular y al transporte de materiales. (148,149)

Por ello, la descomposición del citoesqueleto podría tener amplio efecto en el metabolismo celular y función de la membrana. Rillín y colaboradores (1980) observaron que el tratamiento de cotiledones de papino con estimulante antimicrotubular agravó el daño por frío. (144). Por otra parte, Aszaios, Yang y Gottesman (1985) demostraron en células animales, que la despolimerización de los microtúbulos incrementó la libertad del movimiento de pruebas moleculares, en membranas (5). Como la relación entre los microtúbulos y la fluidez de membrana merece ser continué investigando en vegetales, se considerará como primer respuesta a la baja temperatura, la alteración en la estructura de membrana.

6.1 Alteración en la integridad de membrana.

El daño en la estructura de membrana vinculada con la producción de ATP, sin duda es el generador de las diversas alteraciones presentadas en productos hortofrutícolas.

Se ha podido observar que la relación directa entre la estructura y función de la membrana, es la naturaleza del control bioquímico que ejerce. Tal relación se establece por tres aspectos dependientes de la compartimentación: la regulación de la expresión genética, la actividad enzimática y la dirección del flujo metabólico, así como de otros factores entre los que se citan: la asociación de complejos multienzimáticos, el estado

energético, así como tanto el balance de cofactores como el de compuestos que inducen respuestas en el desarrollo o metabolismo. Generalmente éstos últimos no son metabolitos en el sentido de que no son intermediarios, ni productos en las vías de transformación que controlan y son activos en concentraciones muy bajas. Estos compuestos son denominados fitorreguladores. (p. 125, 127)

Por añadidura, tomando como base lo mencionado, es lógico pensar que el solo hecho de alterar la integridad de membrana vinculada con la producción de ATP, por la exposición de los frutos u hortalizas a bajas temperaturas, dará por resultado un desbalance metabólico general que al mismo tiempo se traducirá en la expresión de síntomas visuales reconocidos como daño por frío.

Con vistas a poder ofrecer una mejor comprensión de ello, es necesario mencionar algunos aspectos sobre la participación de la membrana como barrera física, seguido de los modelos que expliquen su estructura y de esta manera tener una concepción más amplia de la interrelación de los elementos que toman parte en el mantenimiento de la integridad de membrana.

6.2 La membrana como barrera física.

Al comportarse la membrana como barrera física, implica una gran diversidad de mecanismos de transferencia de solutos.

Los solutos pueden atravesar la membrana mediante los

siguientes mecanismos:

- Difusión pasiva.- las moléculas se mueven en favor de un gradiente de potencial sin implicar gasto de energía.

- Fincitosis.- el material es movilizado por la formación de burbujas o vesículas sobre un lado de la membrana descargando sus contenidos por el otro lado. lo cual constituye un proceso no selectivo, porque los solutos no se mueven independientemente sino como parte de una burbuja.

- Transporte activo.- cuando las membranas son sujetas a bajas temperaturas, típicamente sea este el mecanismo predominante, dado que al disminuir la temperatura, se inhibe tanto la actividad metabólica como la acumulación de iones, dando lugar a la fuga de estos mediante gasto de energía y precisamente en el transporte activo, la transferencia efectiva de las moléculas se realiza con gasto de energía, misma que es liberada en el proceso de respiración.

A diferencia del mecanismo anterior, parece ser que en este, las moléculas se mueven en contra del gradiente de potencial, por lo que le confiere alta selectividad. (145, 147, 151, 152)

Luego entonces, aun cuando la membrana se porte como barrera física goza de permeabilidad diferencial, gracias a ella esta capacitada para controlar selectivamente la penetración y salida de ciertas sustancias, permitiendo una vía de entrada en una sola dirección para algunos materiales y puede no dejarlos que vuelvan al exterior. Por lo tanto, la tasa de flujo se verá afectada por

las propiedades de la misma membrana.

Ahora bien, los cambios en la permeabilidad de las membranas han sido asociados como posibles causas del daño por frío.

Partiendo de la observación de que en los productos hortofrutícolas expuestos a temperaturas y humedades relativas bajas, se aprecian sitios suaves en los frutos, en donde la necrosis o la invasión por patógenos inician la pudrición, así como las hojas exudadas es decir, se ven como empapadas en agua, se ha sugerido que cualquiera de esos dos síntomas son debidos a la deshidratación, la cual es causada por la disminución de absorción de agua, insuficiente para competir con la misma alta demanda transpiracional, dando lugar al déficit o estrés por agua.

El déficit por agua a su vez genera la contracción y agrietamiento de la membrana con la consiguiente pérdida de selectividad permeabilidad, evaluada por la velocidad de fuga de sustancias orgánicas e inorgánicas a través de los espacios libres. Dicha fuga es acentuada cuando los frutos u hortalizas son transferidos a temperaturas más elevadas.

En el caso del daño por frío se ha asumido que la baja temperatura "per se" es una condición de estrés, que causa la salida de las susodichas sustancias.

Un gran número de pruebas usadas para determinar el libre movimiento de las moléculas dentro de la membrana, a temperaturas que causan daño por frío en especies sensibles al enfriamiento.

han sido correlacionadas con la disminución severa de la fluidez de la membrana.

Los resultados de las siguientes investigaciones soportan estas ideas.

Se han estudiado las interacciones entre la temperatura y la expansión y contracción celular, encontrando que bajo condiciones de expansión celular a bajas temperaturas existe incremento en el daño de la membrana, determinada por la velocidad de fuga de solutos.

Así, Willing y Leopold (1987) indican que la velocidad de fuga a través de hojas de pepino (Cucumis sativus L. cv. Straight Eight) fue alterada por la temperatura (2, 10 y 25 °C) durante la plasmolisis en forma de un simple fenómeno de difusión: el log. de la velocidad de salida se incrementó en proporción a la temperatura.

Las células se plasmolizan, porque la pared celular es relativamente rígida y el protoplasma se retrae de la pared a medida que se encoge cuando son sujetas en un medio hipertónico, o sea cuando la concentración externa es menor que la celular y por lo tanto el agua difunde al exterior. Esto se logró con sorbitol 0.5 M., por 1 hr.

Sin embargo, durante la desplasmolisis, al transferir las células del medio hipertónico al hipotónico (agua destilada), la velocidad de fuga respondió a la temperatura con un patrón diferente: las temperaturas de enfriamiento (2 y 10 °C)

causaron un aumento en la velocidad de salida de solutos, indicando desorganización en la integridad de las membranas.

De manera similar, se observó una elevada velocidad de fuga al rehidratar con agua fría, hojas desecadas.

Lo cual los conduce a plantear que las bajas temperaturas interfieren en la expansión de la membrana posiblemente por la disminución de la elasticidad, obstruyendo la incorporación de material lipídico al interior de la membrana y al expandirse los tejidos a bajas temperaturas, podría causar lesiones en las membranas, contribuyendo al daño por frío (14). Esto corrobora los estudios por Wolfe y Steponkus (1981) en donde encontraron que el límite de expansión elástica de las membranas del protoplasto fue alrededor de un 2%, sugiriendo que la capacidad para sobrevivir a grandes expansiones dependa de que las bajas temperaturas pudiesen inhibir la síntesis o la incorporación de nuevo material de las vesículas protoplasmáticas al interior de las membranas y por lo tanto contribuir al estrés físico de desplasmolisis o expansión.

En algunas especies como durazno y berenjena, la salida de electrólitos permaneció baja y no apareció alterada mientras se mantuvieron a temperatura de enfriamiento pero se incrementó dramáticamente al transferirlos a temperaturas de maduración. (Furmanski y Buescher, 1979) (13).

Ya en el transcurso de los estudios sobre las respuestas de tejidos de hipocótilos de pepino al enfriamiento, Sisson y

Bramlage (1978) habían observado que la salida de iones se presentó previa a la elevación respiratoria. Similarmente, Lieberman et. al (1956) encontraron la fuga de iones precedida a los cambios en actividades oxidativas y fosforilativas en mitocondrias aisladas de camotes enfriados. Muchos de los solutos que escaparon de los camotes fueron iones K^+ (14). Lewis (1961), reportó que la tasa de escape en tomates fue aun mayor despues del almacenamiento a temperaturas elevadas (14).

Por lo que concierne a la sensibilidad de las diversas especies al enfriamiento, Fantastico (1968) reportó que la liberación de iones resultó aproximadamente 3 veces mas en limas y toronjas (especies consideradas sensibles al enfriamiento) que en naranjas (especie relativamente resistente (14)). De manera similar, Lewis y Workman (1964) encontraron que a 0 °C el escape de electrolitos de tomates dañados aumentaba con rapidez. En cambio, a esta temperatura, las coles no dañadas mostraron una tasa constante de escape de iones (14).

Otros estudios como los de Christiansen et. al (1970) evaluando la salida de carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa y aminoácidos en raíz de algodón; Fukushima y Tsugiyama (1977), iones (calcio, potasio y magnesio), azúcares reductores (fructosa), polisacáridos (aunque no lo especifican probablemente se refieren a la xilosa, galactosa, glucosa, manosa y arabinosa, puesto que son los productos comunes por hidrólisis de la pared), azúcares no reductores (sacarosa)

y proteínas en pepino var. 'Tokiwahikari'; Carey y Berry (1978), rubidio en cebada y maíz; Christiansen (1979), carbohidratos y glicina en raíces y brotes de algodón; Murata y Tatsumi (1980), potasio en pepino, melón, calabaza, chayote, papa, cebolla y zanahorias y Zsoldos y Farkaly (1980), potasio en cebada, trigo, arroz, pepino y melón. Entre otros investigadores, coinciden que después de someter los productos a baja temperatura, se presenta una marcada liberación de las sustancias indicadas. (14, 30, 34, 134)

En su interesante estudio, Petri (1979) noto que las temperaturas altas favorecen la absorción de aniones en zanahorias, en tanto las temperaturas bajas, la salida de cationes. (14)

En condiciones normales, el movimiento de iones a través de la membrana, generalmente presentan baja permeabilidad debido al tamaño de su envoltura de hidratación y a su escasa solubilidad lipídica por lo tanto, las fuerzas que actúan sobre los iones incluyen gradientes de potencial o gradientes de potencial de carga. (14)

De hecho no tan solo las bajas temperaturas inducen la liberación de solutos. Christiansen y col. (1970), indican que también están en función de factores como: pH bajos, anaerobiosis y déficit de agua, que bien podrían pensarse como consecuencia del primero. Ellos determinaron la fuga de carbohidratos y aminoácidos en raíz de algodón efectuando una serie de

experimentos diferentes, en los que utilizaron temperaturas de 5, 10, 15 y 31 °C por 4 días bajo distintas condiciones como la adición de CaSO_4 ó MgSO_4 a 10^{-3} M, EDTA a 2×10^{-3} M, variando pH, adicionando agua y atmósfera de nitrógeno (anaerobiosis).

Observan que las elevadas fugas de carbohidratos y aminoácidos son proporcionales al tiempo de exposición a temperaturas bajas. Además, dependiendo de la temperatura se libera tal o cual soluto, por ejemplo, a 5 °C notan liberación de carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa, mientras que a 31 °C solo identifican sacarosa.

A temperaturas elevadas de almacenamiento disminuye la liberación de carbohidratos y aminoácidos, siendo mayor la de los primeros, evidenciando una leve discontinuidad en las curvas a temperaturas cercanas a 10 °C, lo cual se atribuye al cambio de fase en la membrana (de acuerdo a lo mencionado en el punto 5).

Por otra parte, la salida de tales solutos, aumenta en la medida que se reduce el pH (3 a 2), en el intervalo de 4 a 9 es poca la diferencia. Esto podría explicarse en base a lo sugerido por Dalziel y Breidenbach (1979), quizás dicho comportamiento se deba a un ambiente protonado por la presencia de grupos polares de los fosfolípidos presentando la posibilidad de que interaccionen con otros compuestos lipídicos modificando el arreglo molecular de la estructura de membrana, lo cual altera la fase de transición y por ende sus propiedades.

Bajo atmósfera de nitrógeno a 31 °C, en esta condición se

sigue produciendo CO_2 , menor cantidad de energía y como productos de respiración anaerobia, acetaldehído o etanol, consecuentemente una disminución de agua que altera la difusión de solutos por el gradiente de concentración que se establece. En el presente caso, la liberación de carbohidratos aumento con respecto al control de 18 a 89 g / semilla.

Los resultados de Christiansen, hasta el momento, sugieren que a temperaturas bajas se tienen condiciones de anaerobiosis por la similitud en la conducta que sigue la liberación de carbohidratos con respecto a la temperatura, comparada con la atmosfera de nitrógeno.

En lo que se refiere al efecto de cationes divalentes en la liberación de solutos, Christiansen y col. (1970) sostienen que tanto el calcio como el magnesio son igualmente efectivos para disminuir la fuga de carbohidratos, aunque con la influencia del pH bajo disminuye el efecto de tales cationes aún a altas concentraciones. A partir de éstas observaciones los mismos investigadores concluyen que el enfriamiento no solo incrementa la permeabilidad del plasmalema sino también la de otras membranas, provocando el deterioro de las relaciones entre los espacios intercelulares generando así mismo una fuerte y más amplia alteración metabólica.

Los iones calcio, potasio y sodio, presentan el fenómeno de antagonismo, esto es, si un vegetal es colocado en una solución de potasio va a acumular iones de este hasta alcanzar niveles

tóxicos, pero si en la misma solución se adiciona calcio en pequeñísimas cantidades, la absorción de potasio se reduce considerablemente y no presenta toxicidad.

De forma parecida, el calcio antagoniza al sodio y también el sodio o el potasio con el calcio, pero el sodio no interfiere en la absorción de potasio.

En cuanto a la liberación de potasio a bajas temperaturas, los cationes monopositivos como litio, sodio, cesio y rubidio, reducen la anomalía, mientras que los cationes divalentes por ejemplo el calcio, magnesio, estroncio, manganeso, actúan prácticamente con la misma eficiencia tal anomalía, pudiéndose interpretar como un antagonismo de estos cationes hacia el potasio. (Zsoldos y Karvaly, 1979).

Una posible explicación al fenómeno, sugiere que el calcio es necesario para la integridad estructural de la membrana ya que en su ausencia los mecanismos de transporte se interrumpen, incrementando la permeabilidad (Bangerth, 1979; Poovaiah, 1980).

Dado que a lo largo de numerosas investigaciones sobre la liberación de iones, se detecta que el potasio es el de mayor proporción, Zsoldos y Karvaly (1979) han sugerido una explicación tentativa del daño por frío en membranas, indicando que por efecto del frío, se retrae drásticamente el plasmalema de la pared celular primaria, acompañado de la fractura de componentes proteicos y lipídicos enlazados a la pared y membrana celular. En consecuencia, nuevos sitios de enlace de cationes son

formados dentro y en la pared celular, los cuales sirven como camino para el intercambio de cationes por potasio en un transporte pasivo. Esto aunado a un cambio de fase, incluyendo el de la membrana mitocondrial, en donde por efecto de anaerobiosis, disminuye el ATP, crea un exceso de protones así como un potencial electroquímico dentro de la célula que provoca el intercambio selectivo de potasio y protones. Esta manifestación de cambio unidireccional conlleva a la anomalía que presenta el movimiento del potasio guiando a daños estructurales y funcionales de las membranas celulares.

Desde otro punto de vista, la importancia sobre la fuga de solutos y su relación con la permeabilidad de membrana asociada con los daños por frío, estriba en que los iones juegan un papel esencial en el metabolismo.

A manera de ejemplo, el calcio ha recibido considerable atención por su relación con los procesos fisiológicos como la estabilidad de las membranas, su participación como cofactor e inhibidor de enzimas tal como la poligalacturonasa que provee la propiedad de firmeza en los tejidos de frutos y hortalizas.

En una revisión que se hace acerca de los efectos del calcio en el desorden fisiológico de las plantas, Bangerth (1979) menciona que el calcio es importante en la mantención de la permeabilidad celular, proponiendo que se encuentra enlazado a ciertos componentes de la membrana como fosfolípidos, colesterol o grupos carboxilo, modificando quizás la conformación de las

moleculas de la membrana.

Además, el calcio activa a algunas enzimas como la fosfolipasa en hojas de col.

Por otro lado, el magnesio tambien es activador de enzimas como: glucoquinasa, fructoquinasa, galactoquinasa, hexoquinasa, gluconolactonasa, enolasa, carbonilasa, fosfopentequinasa, deshidrogenasa-5-fosfogluconica, etc. y el potasio activa la enzima piruvato quinasa y ATPasa. entre otras no menos importantes.

La lista de funciones es innumerable y puesto que no es el objetivo, solo se hará hincapie en que cualquier alteracion que sufran los iones por efecto de la baja temperatura, repercutirá en el equilibrio del metabolismo.

En contraposicion, Lewis (1956) no encontró cambios en la salida de iones de tomates previamente almacenados a distintas temperaturas. El escape de K^+ de frutas citricas " Natsudaikai " no vario de manera significativa al comparar las muestras enfriadas con las no enfriadas (Iwata y Ogata, 1967). Además, Murata y Tatsumi (1979), estudiando el efecto de la temperatura en la liberacion de potasio en especies sensibles y resistentes al enfriamiento, reportaron que las especies resistentes guardan una relación lineal entre la concentración de potasio con respecto al inverso de la temperatura, pero la cebolla y zanahoria presentaron curvas discontinuas similares a las de especies sensibles en un intervalo de temperatura de 5 a 10 °C.

Los mismos investigadores al comparar la fuga de iones entre especies sensibles al frío (pimiento y tomate) y resistentes al frío (papa), observan que en el tomate maduro ocurre mayor liberación a 12.5 que a 2 °C, en la papa sucede exactamente lo contrario, mientras que en el pimiento no hay variación significativa.

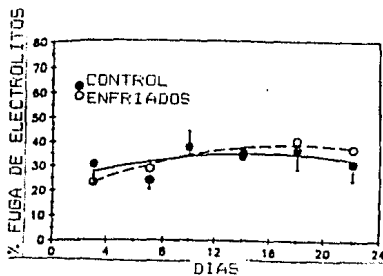
Por otra parte, Kirk y Shu-Jung (1989), cuestionan en base a sus resultados la salida de electrólitos como determinación del daño por frío en pepino, puesto que al intentar correlacionar el desarrollo del daño por frío, mediante los síntomas visuales que experimenta el pepino, con el incremento de fuga de electrólitos (parámetro frecuentemente empleado para indicar el daño físico del plasmalema resultado del estrés por baja temperatura), encuentran que los incrementos substanciales en la fuga de electrólitos, tienen lugar después de que el fruto exhibió síntomas de daño por frío.

El cultivar usado en éste estudio (Hybrid C.) no muestra incremento en la fuga de electrólitos durante el estrés al enfriamiento como otros cultivares (Marketmore / Carolina) utilizados en los estudios de Murata y Tatsumi (1979), lo cual parece probar que el cultivar Hybrid C. puede ser moderadamente sensible al daño por frío comparado con los otros.

Mientras que en algunas especies, el incremento en la salida de electrólitos indica anticipada respuesta al enfriamiento, en otros sensibles al frío, no.

Como puede apreciarse en la grafica 5, donde se muestran los resultados de Parkin y Shu-Jung (1989), hubo solo un incremento del 20-25 % a 35-40 % en la fuga de electrolitos del mesocarpo de pepinos mantenidos a 4 y 14 °C (control) por 22 dias de almacenamiento.

GRAFICA 5. Salida de electrolitos del mesocarpo de pepinos almacenados a 4 o 14 °C.

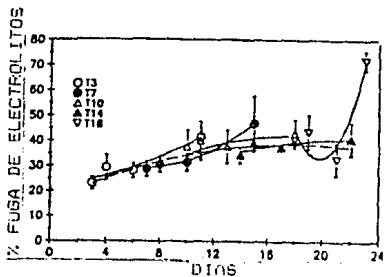


FUENTE: Plant Physiol., 90: 1049-1056 (1989).

En cambio, al ser transferidos de 4 a 14 °C después de un enfriamiento por 18 días, ocurrió un marcado incremento en el escape de electrolitos.

El comportamiento que siguieron los frutos después de un enfriamiento por 3 (T3), 7 (T7), 10 (T10), 14 (T14) y 18 (T18) días, para luego ser transferidos a 14 °C se muestran en la grafica 6.

GRAFICA 6. Salida de electrolitos del mesocarpo de pepinos almacenados por 3, 7, 10, 14 y 18 días a 4 °C y transferidos a 14 °C.



FUENTE: Plant Physiol., 90: 1049-1056 (1989).

Mientras tanto, en la gráfica 7 se reporta el índice de daño por frío observado durante el mismo experimento descrito, en donde los valores representan:

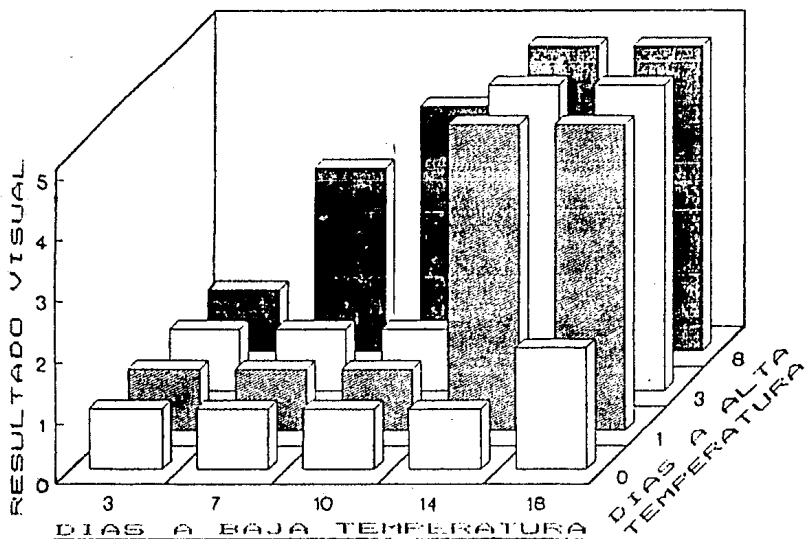
- 1 = no hay daño
- 2 = vestigios de daño (marchitamiento / picado en algunos frutos)
- 3 = daño ligero (marchitamiento / picado en todos los frutos)
- 4 = daño moderado (picado, depresiones en la cáscara y oscurecimiento interno)
- 5 = daño severo (tejido colapsado e inicio de pudrición).

Los controles llegaron a la senescencia manifestada como

amarillamiento y marchitamiento de la cáscara a los 10 días.

Después de los 18 días a 4 °C aparecieron los primeros síntomas de daño, llegando a pronunciarse a los 22 días.

GRAFICA 7. Determinación visual de daño por frío en pepinos cv. Hybrid C..



NOTA: (*) Evaluados después de 5 días a 14 °C, los frutos que fueron enfriados 18 días.

FUENTE: Plant Physiol., 99: 1049-1056 (1989).

Los frutos transferidos a 14 °C después de 3 días de enfriamiento, no mostraron signos de daño y la senescencia

comenzó a los 8 días.

Basado en los resultados, se observa que el daño reversible requiere de 3 a 7 días de continuo enfriamiento. A los 8 días adicionales, a 14 °C se detecta daño por frío. (42)

Al punto que, esto obliga a confiar principalmente en la determinación visual más que en la detección de liberación de electrolitos, para evaluar daño por frío.

Conforme a lo mencionado, la asociación de la permeabilidad de las membranas con los daños por frío a pesar de todo presenta dificultades.

No está muy claro si las diferencias en permeabilidad de los tejidos de especies sensibles y resistentes, se debieron a un movimiento pasivo del agua o si también intervino el movimiento de solutos. Gliuka y Feinhold (1952), concluyeron que el aumento en la resistencia al flujo del agua al descender la temperatura, puede explicarse de manera satisfactoria por el cambio de la viscosidad del agua con el cambio de temperatura.

Una segunda dificultad consiste en que la variación en la fuga de iones depende del tejido. Así, Fantástico (1968) demostró que a temperatura ambiente (27 °C) el incremento en conductividad del exudado de plátanos fué más del doble que la que se obtuvo en limón y toronja.

Aparte, Yu Liang et. al (1982) comprobaron los cambios en la permeabilidad del plasmalema en diferentes sitios del pepino. Los pepinos almacenados a 3 °C fueron divididos en 3 secciones:

una ubicada próxima al centro, la parte media y la más distante del centro. En donde esta última resultó ser la más sensible al daño por frío. (122)

Lo cual demuestra que los efectos observados en los estudios descritos, podrían atribuirse a las características inherentes a los sistemas de tejidos y algunos otros factores que se citan en el punto 11.

La tercera consideración para validar la hipótesis de la asociación de la permeabilidad con temperaturas bajas es, llevar a demostrar que el cambio en la permeabilidad es una respuesta temprana al enfriamiento, ya que no quedó claro en los estudios de Lyons (1962, 1964). (76, 71, 121)

Hasta ahora, la suspensión de la ciclosis protoplasmática es el síntoma más temprano al enfriamiento que se ha podido demostrar. (121), aunque cabe señalar que también existen controversias puesto que hay quienes aseguran que ocurre cesación de tal ciclosis.

Desde 1864, Sachs presumió que el flujo protoplasmático cesaba alrededor de los 11 °C en especies sensibles, Cucurbita pepo y Lycopersicon esculentum, comparada con los 0 °C en especies resistentes. (124)

Más tarde (1961) Lewis confirmó que el flujo cesó a 10 o a 5 °C en todas las especies sensibles al enfriamiento probadas incluyendo tomate, sandía, melón ' Honey Dew ' y camote, mientras que en especies resistentes tales como habano y zanahoria, el

flujo todavia continuo hasta 2.5 a 0 °C. (134).

Sin embargo, Wheaton (1963) reporto que el flujo protoplasmático se suspendio a los 0-2 °C por espacio de 1-2 minutos en raices de melon, tomate, sandia y pimiento, en cambio en raices resistentes de col, lechuga, calabaz y epidermis del bulbo de cebolla, hasta por abajo de los 2 °C.

Por otro lado, Patterson y Graham (1977), no hallaron una temperatura especifica para que el flujo sea interrumpido bruscamente, en especies sensibles. En lugar de eso, observaron que el flujo en células de Lycopersicon esculentum, Lycopersicon hirsutum, Citrullus vulgaris, Tradescantia albiflora, Digitalis purpurea y Veronica persica, disminuyó conforme la temperatura fue reducida, lo cual indico que la velocidad de flujo esta correlacionada con una adaptacion genetica a bajas temperaturas. (134).

Las posibles razones para explicar la variación del flujo protoplasmático en respuesta a las temperaturas de enfriamiento podrian basarse en lo siguiente:

- a) El papel que juegan los lípidos en la estructura y función del protoplasma.
- b) El suministro de energía provista por la respiración para mantener el flujo protoplasmático.
- c) La utilización de la energía para el flujo.
- d) La viscosidad protoplasmática, y
- e) La diferencia en permeabilidad a bajas temperaturas de los

sistemas enzimáticos responsables de la utilización del ATP para el flujo. (134)

6.3 Modelos de la estructura de membrana.

Para comprender como repercute la alteración de la integridad de membrana por la baja temperatura en la fisiología vegetal, se precisa del establecimiento de un modelo.

Es fundamental considerar como constituyentes principales de la membrana a los lípidos y proteínas, los cuales varían en proporción y naturaleza cualitativa dependiendo del tipo de membrana dado que está en función del organelo, la especie, variedad, estado de madurez, condiciones fisiológicas, etc. (134). Esto concuerda generalmente con el hecho de que los enlaces covalentes entre lípidos y proteínas, no son importantes para el mantenimiento de la integridad de membrana, puesto que para que ocurra la disolución de la mayor parte de la membrana sólo requiere de condiciones que perturben la débil interacción polar y no polar entre las moléculas, sin llegar a la descomposición de los enlaces covalentes.

Todo ello, entre otras cuestiones, ha propiciado una serie de paradojas con enormes diferencias en interpretación por parte de los diversos investigadores que se han avocados a propugnar modelos que explican la estructura de membrana, sin que a la fecha exista un modelo totalmente aceptado.

Se han hecho varias proposiciones. en 1935, Danielli y Davson proponen un modelo designado como " escasez molecular " o " paucimolecular ", que describe a las membranas como una estructura obtenida por un arreglo simétrico de bicapa continua de fosfolípidos (estabilizada por interacciones hidrofóbicas) cubierta con proteínas en conformación β vía asociación electrostática.

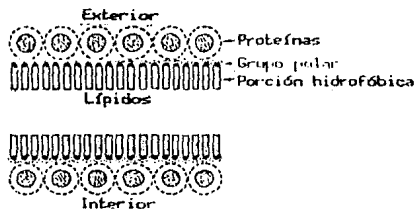


DIAGRAMA 3 Modelo de Danielli y Davson (1935).

Después, J.D. Robertson y colaboradores (1960), observando por micrografía electrónica una constante apariencia básica de las membranas, plantean un modelo que no es más que la extensión del modelo " paucimolecular " denominado " membrana unitaria " o " unit membrane ", en el que la membrana parece estar compuesta por tres capas, las dos externas principalmente de proteína extendida y una capa bimolecular interna de lípidos arreglada de tal manera que su porción hidrofóbica está orientada en sentido

opuesto a la otra capa y el grupo polar se encuentra acoplado a las capas de proteína.

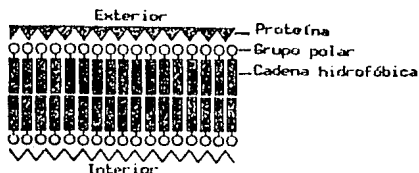


DIAGRAMA 4 Modelo de Robertson (1960).

Los datos obtenidos por Branton (1967) y Vandenhoez (1971) en determinaciones con polarización óptica, difracción de rayos X, microscopía electrónica, tensión superficial, análisis químico y sistemas de modelos de fosfolípidos, han sido interpretados como coherentes con la distribución del modelo " membrana unitaria ".

No obstante, Korn (1969), así como Staehelin y Probin (1970) demuestran que dichas interpretaciones de los datos son erróneas, reflejo de la utilización de varios tipos de artefactos (equipos, técnicas) en la etapa preparatoria y al paso de los años se observa son compatibles con los modelos ya planteados. De

acuerdo con éstos investigadores, el diagrama 5 muestra tal y como ha sido descrita la estructura de membrana con dos interpretaciones diferentes al respecto. Como puede percibirse " la estructura sería extremadamente estable, soportada por fuerzas polares y por fuerzas de atracción como enlaces hidrogeno y fuerzas de Van der Waals, aunque suficientemente flexible si se toma en cuenta el hecho de que tales membranas no son estructuras estáticas; son capaces de moverse, reventar o romperse y reconstruirse para producir vesículas mediante repliegues que se rompen a presión " (mecanismo de pinocitosis).

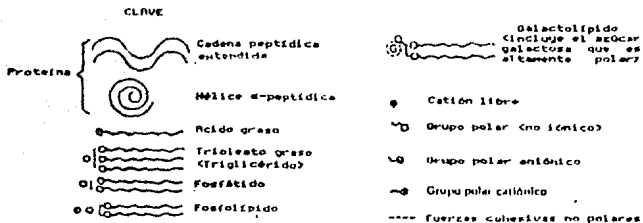
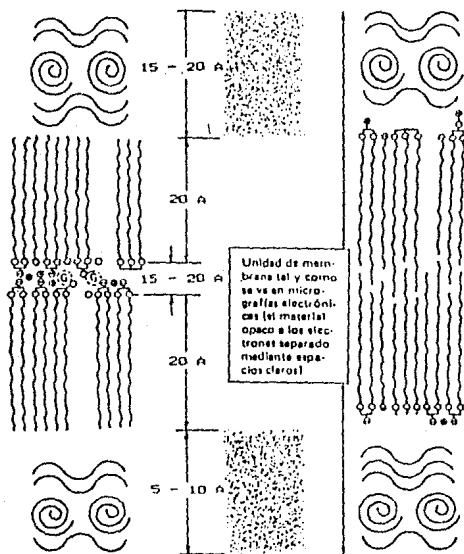
Por consiguiente, no están de acuerdo muchos investigadores con el modelo de " membrana unitaria " ya que las propiedades físicas y químicas de la membrana no han podido ser explicadas en base a las interacciones polares de la bicapa lipídica con proteína extendida.

Las determinaciones con dichroísmo circular, dispersión óptica rotatoria y con espectroscopia infrarroja, sugieren que pocas o ninguna de las proteínas de la membrana existen en conformación β , en términos generales contienen importantes cantidades de proteínas helicoidales en un acomodo al azar.

Existen evidencias que las proteínas de las membranas están asociadas con las cadenas de ácidos grasos de fosfolípidos con residuos acil y no con residuos polares como lo sugerido en el modelo de " membrana unitaria ".

También, ciertas unidades repetitivas de lipoproteína pueden

DIAGRAMA 5 Interpretaciones de la estructura de membrana por Korn (1969) y Staehelin y Probin (1970).



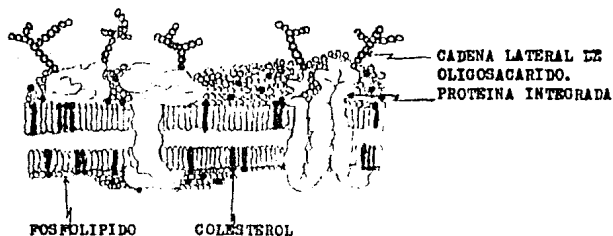
FUENTE: Fisiología vegetal. H.G.S. Bidwell. RGI Ed. S.A. México.

estar discretamente disociadas dentro de la membrana y algunas membranas parecen estar compuestas por lípido-proteína-lípido en vez de proteína-lípido-proteína.

Además ciertas membranas son asimétricas, teniendo una capa proteica más gruesa o en lugar de capas se observan glóbulos de proteína.

Estas observaciones se fueron detectando en la revisión sucesiva de los modelos que le siguieron al de "membrana unitaria", tales como el de Frey-Wyssling y Mühlenthaler (1965), Mühlenthaler y co. (1965), Benson (1966), Leonard y Singer (1968), Glauret (1968), Lucy (1968) y el de Vanderkooi y Green (1971). Sin embargo, hasta el momento los modelos de Jonathan Singer y Earl Nicolson (1972) y Racker (1976), satisfacen una explicación razonable de la función y estructura de la membrana. En ellos, la membrana consiste en una bicapa fluida de fosfolípidos dentro de la cual se encuentran intercaladas las proteínas. Estas insertan su dominio hidrófobo en el seno de la bicapa lipídica y permiten que los hidrófilos emerjan en el medio acuoso exterior.

Se tienen las denominadas proteínas transmembranosas flotando como un iceberg sobre la bicapa, las proteínas integrales o intrínsecas con una o varias zonas inmersas en la bicapa lipídica, la atraviesan o no, y las periféricas o extrínsecas reciben tal apelativo por estar unidas a uno u otro lado de la membrana sin penetrar en la bicapa.



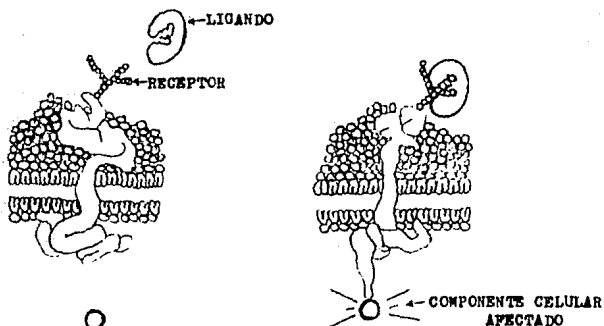
La bicapa es esencialmente fluida y las moléculas en su interior se mueven con entera libertad y se reorganizan adquiriendo nuevas formas sin perder los contactos que satisfagan su atracción mutua, por lo que requiere que las colas hidrofílicas puedan deslizarse sin limitación entre sus congéneres. Esta capacidad depende a su vez de la temperatura. Por debajo de cierto valor crítico, llamado temperatura de transición, que está en función de la naturaleza de los lípidos implicados, las cadenas hidrofóbicas quedan en una estructura rígida y ordenada que deja de ser compatible con las funciones propias de la membrana.

Hay sustancias insertas que pueden entorpecer el deslizamiento de las cadenas hidrofóbicas, como el colesterol, con su estructura anular plana y rígida hace que la membrana sea inflexible hacia la periferia ya que no alcanza el núcleo central.

Los lípidos difunden más rápido en forma lateral que

transversal (flip-flop) mientras que las proteínas no realizan difusión transversal debido a sus regiones polares más extensas y lateralmente algunas proteínas integrales pueden difundirse en el plano de la membrana siendo dirigidas por componentes citoesqueléticos, en tanto otras proteínas pueden estar restringidas en su movilidad.

Deben existir mecanismos específicos para mantener tanto la composición como la asimetría de la membrana. Las proteínas constantemente son separadas y reemplazadas por las recién sintetizadas. De esta manera las membranas se encuentran en un estado dinámico de recambio, no solo con movimientos de lípidos y proteínas, sino también con moléculas que entran y salen. Esto puede ser explicado en base a que muchos de los componentes proteicos que asoman a la superficie son glicoproteínas, con cadenas laterales de oligosacáridos, también se hallan glicolípidos y estos muchas veces funcionan como receptores.



Al enlazarse el ligando al receptor, ocurre en este último un cambio conformacional que afecta a una de las proteínas periféricas estableciendo directa comunicación entre el exterior e interior celular.

Otra forma de como puede atravesar determinada sustancia la membrana es mediante el efecto "puerta" es decir, se abre temporal un canal.

Cabe aclarar que existen continuas modificaciones en los modelos porque muchas de las observaciones no pueden ser explicadas fácilmente, quizás debido al hecho de la especialización de los organelos y por lo tanto de sus membranas, la gran diversidad de técnicas de aislamiento y purificación, así como la amplia diferencia de origen y capacidad fisiológica del material con el que han experimentado. Lo cual podría ser las otras cuestiones, referidas con anterioridad, las que impiden a los investigadores aventurarse a una ordenación molecular de lípidos y proteínas. En consecuencia, no se debe inclinarse a establecer una ubicuidad fundamental en la estructura de las membranas y puede resultar inapropiado aventurarse al establecimiento de un modelo universal.

De acuerdo a ello, el estudio del daño por frío se vuelve complicado.

7. RESPUESTA SECUNDARIA DEL DAÑO POR FRÍO.

Si bien, aun no conociendo plenamente la estructura de la membrana, sin eludir desde luego su importancia, se puede asegurar que debido a su alteración por bajas temperaturas aparecen los desórdenes apreciados visualmente en especial en frutos y hortalizas.

7.1 Síntomas de daño por frío.

Las manifestaciones externas e internas del daño en los vegetales sometidos a baja temperatura, tal como se ha venido mencionando, suponen ser la consecuencia de la pérdida en la integridad de membrana y por ende el desbalance del proceso básico de producción energética efectuada en la mitocondria, la respiración.

Su aparición puede ser retardada por las mismas temperaturas bajas, que han dado lugar a la disfunción fisiológica, puesto que los síntomas se desarrollan o acentúan posteriores a la exposición al enfriamiento es decir, al transferir los vegetales a temperaturas superiores.

Estas manifestaciones no solo resultan por estrés por frío, pero como quiera que sea, existen algunas de carácter visual que pueden ser indicativas del daño por frío.

Dichos síntomas pueden expresarse en las semillas

germinando, brotes, frutos y hortalizas.

a) Frutos y hortalizas.

Los síntomas más frecuentes que se traducen dentro de las pérdidas poscosecha son:

1. Lesiones en la superficie.- manchas acuosas hundidas, picado o manchas generalizadas en la superficie, predominando cuando el epicorpo es delgado o tan suave como la pulpa, mientras que cuando es más duro y grueso que las capas adyacentes, se presentan cavidades.

El desarrollo de estas, muestra la importante relación que existe entre las características del producto, la presencia de daño mecánico, la severidad del tratamiento de enfriamiento y la humedad relativa del medio.

2. Hinchazón de los tejidos.- este se manifiesta como un ablandamiento posiblemente como resultado de la desorganización de la estructura celular concomitante a la liberación o salida de solutos a través de la membrana.

Ello favorece el desarrollo de microorganismos.

3. Oscurecimiento de la pulpa, tejido vascular y semillas.- podría suceder por la pérdida de la integridad de la membrana celular, ya que al parecer aumenta la entrada de O_2 a través de la misma, entonces los fenólicos de alto peso molecular y los ácidos clorogénico, shikímico y cafeico, entre otros, se oxidan presentándose como cuerpos granulares oscuros que se tornan opacos cuando se acumulan alrededor del tejido.

4. Deseccacion parcial de los tejidos.- presumiblemente debido a que en algunos casos las celulas que se encuentran entre los vasos y la epidermis se colapsan.

5. Incapacidad para madurar.

6. Acelerada velocidad de senescencia, pero con diferente apariencia a la normal.

7. Incremento de la susceptibilidad al ataque de microorganismos especialmente por aquellos que no se hallan ordinariamente.

8. Disminucion de la vida de almacenamiento o vida de anaquel debido a una o más de las antedichas respuestas.

(1, 2, 10, 29, 30, 31, 44, 73, 83, 84, 110, 132, 141)

Desde luego, cabe hacer mención que existen un sinnúmero de factores de los cuales depende la manifestación expresa, y que no se mencionan en los reportes disponibles. Sin embargo, en términos generales en la tabla 7.1.1 se presentan algunos ejemplos de síntomas específicos para frutos u hortalizas de origen tropical o subtropical y templado.

b) Brotos o retoños.

El síntoma visible más común en brotes intactos de plantas de origen tropical o subtropical tales como los de pepino, tomate, maíz y algodón dañados por frío, es la pérdida de agua, la cual provoca un serio marchitamiento durante la exposición al enfriamiento.

TABLA 7.1.1 Síntomas visuales en frutos y hortalizas provocados por el daño por frío.

FRUTA U HORTALIZA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	SÍNTOMAS
ORIGEN TROPICAL O SUBTROPICAL			
Toronja	0 - 1 4 - 5	2 semanas 2 semanas	Manchado superficial uniforme color pardo. Cavidades en el flavedo.
Plátano	5	24 horas	Madurez retardada, manchas generalizadas color kaki y manchas acuosas verde oscuras en la cáscara, frutos quebradizos, endurecimiento de la placenta central, oscurecimiento del tejido vascular.
Papaya	10 - 12	5 - 7 días	Madurez retardada, maduración poco uniforme incremento a la susceptibilidad al ataque por hongos.
	5	7 -14 días	Deora o ausencia de la maduración, pulpa acuosa, cavidades en la cáscara.
Mango	12 - 15	5 días	Madurez anormal, picado y manchas color grisáceo en la cáscara, oscurecimiento de pulpa especialmente cercana a la semilla.
Tomate rojo	7.2	3 días	No se produce el color rojo, manchas acuosas.
ORIGEN templado			
Espárrago	0 - 3	3 - 4 semanas	Oscurecimiento y ablandamiento de la punta del tallo.
Durazno y Nectarina	0 - 5	2 - 4 semanas	Desarrollan "manchas" como fruta de textura "pasada", oscurecimiento de la pulpa alrededor del hueso, pérdida de su habilidad para madurar.
Ciruela	0	1 mes	Oscurecimiento de la pulpa.
Papa	0 - 2	20 semanas	Oscurecimiento cobrizo (mahogany browning), decoloración de la epidermis.
Manzana	0 - 4	Algunos meses	Pardeamiento del corazón (brown core) u oscurecimiento dentro del área del corazón (core flush); escaldado suave (soft scald) por la muerte de zonas de epidermis y colapso de pericarpio; hidrosis (soggy breakdown) es un ablandamiento y oscurecimiento de la cáscara y deterioro a baja temperatura (low temperature breakdown, LTB) es un oscurecimiento interno y del pericarpio.

FUENTE: HortScience, 17(2): 161-168, (1982); HortScience, 22(3): 452-454, (1987); Physiologia plantarum, 22: 401-411 (1969); Fisiología de la postrecolección manejo y utilización de frutos tropicales y subtropicales, CECSA, (1979).

Este marchitamiento se ha atribuido a cambios en la permeabilidad de membrana, posiblemente del plasmalema.

No se desarrollan síntomas si la temperatura de enfriamiento no ha sido lo suficientemente baja o si el periodo de enfriamiento no fue prolongado y los brotes pueden recobrar su turgencia al ser expuestos a temperaturas superiores después del enfriamiento. De esta manera, puede impedirse su desarrollo temporal o permanente, dependiendo de las especies de las plantas.

Pero si sustenta daño severo, se aprecia la desecación y necrosis de las hojas e incluso la muerte de todo el brote. (139)

c) Semillas germinando.

Los síntomas de daño por frío en semillas germinando pueden ser expresados inmediatamente o después del periodo de exposición al frío. (139)

Para que las semillas germinen es necesario que las condiciones de oxígeno, temperatura, luz, edad de las semillas, y agua, entre otras, sean las adecuadas.

El agua constituye un factor primordial, puesto que las semillas están extremadamente deshidratadas, por lo que deben absorber una buena cantidad antes de iniciar la germinación. Ésta toma rápida de agua que corresponde al primer estadio de la germinación se le denomina, Imbibición. (145, 147, 151)

Buena pues, cuando se dá la imbibición durante el enfriamiento, provoca un desarrollo imperfecto de la radícula

(parte del embrión que dará origen a la raíz de la planta) en semillas de maíz (Cal y Obendorf, 1972) y de algodón (Christiansen, 1964).

La lesión en la radícula del grano de maíz es inducida por la imbibición a humedad y temperaturas bajas (Cohn y Obendorf, 1976); sin embargo la plúmula (el otro extremo del embrión que formará el tallo y las hojas) fue menos sensible al enfriamiento (Cal y Obendorf, 1972).

Christiansen (1964) asocio un tipo específico de daño para cada uno de los dos periodos de sensibilidad al enfriamiento exhibida por la semilla de algodón:

Primero.- Cuando la semilla es enfriada en el comienzo de la imbibición sucede el desarrollo imperfecto de la radícula.

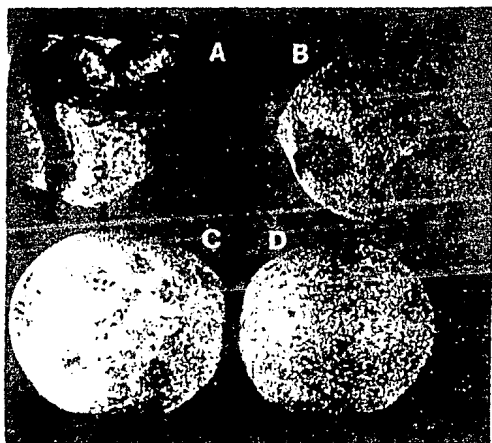
Segundo.- Cuando la exposición al enfriamiento tiene lugar 24 hrs. después del empiezo de la imbibición, se daña la corteza de la raíz.

La imbibición de las semillas de frijol a humedad y temperaturas bajas, puede inducir el agrietamiento transversal de los cotiledones, impidiendo el crecimiento del eje de reserva alimenticia (Pollock y Manalo, 1970).

Los efectos nocivos del enfriamiento de las semillas se reflejan durante el periodo de crecimiento, por ejemplo en el

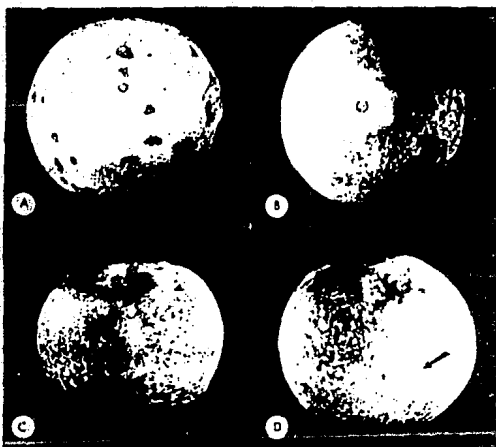
crecimiento retardado de los brotes, así como la disminución de la producción de cosechas y reducción de la calidad del producto cosechado. (127)

FRUTOS DAÑADOS POR FRIO.



- A. Pimiento picado.
- B. Limón con cavidades pardo-rojizas (mancha roja), y glándulas oleíferas más oscuras que las regiones circundantes (peteca).
- C. Toronja con manchas oscuras (Brown staining).
- D. Toronja con picadura (Pitting).

Picado típico de Toronja ' Marsh ' almacenada a 4:4 °C por 7
semanas.



Sintomas de daño por frío en pepinos expuestos a 0 °C.



Arrugamiento fino vertical (Vertical fine wrinkles) y hundimiento de las espinas (sinking of the spines).



Picado superficial (Shallow pittinge).

Sintomas de daño por frío en pepinos expuestos a 5 °C.



Arrugamiento fino desordenado (Random fine wrinkles).



Grandes depresiones profundas (Large deep depressions).

8. RELACION ENTRE EL SINDROME DE ENFRIAMIENTO Y LA RESPIRACION.

Por mucho que el daño patente sea acusado, entre otras, a las características de la especie, todos éstos síntomas revisados en el capítulo anterior suponen ser solo anomalías secundarias denominadas " síndrome del enfriamiento ".

Sin la más mínima duda, tal síndrome debe tener su origen en la escasez de alta energía de manera típica de ATP, requerida para el mantenimiento de la organización celular en presencia de procesos enzimáticos, lo que continuamente tiende a desorganizar el sistema.

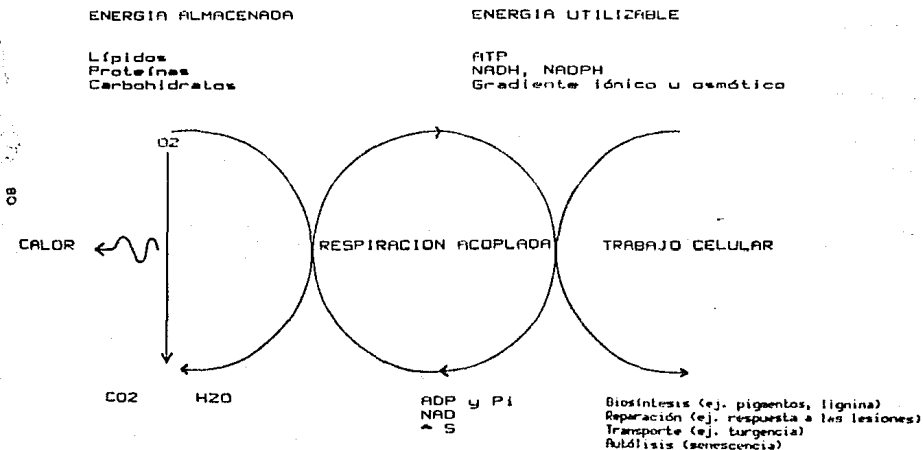
El ATP es producto del proceso efectuado en la mitocondria, la respiración. (ver punto 3)

8.1 Respiración acoplada.

La respiración acoplada, oxida la energía química almacenada, transformandola en energía utilizable y calor, como se muestra en el diagrama 6.

Farece ser que dicho acoplamiento determina la vida del producto, aunque no está claro porque varía la velocidad respiratoria de las diversas especies, existen indicios que sugieren estar en función de las necesidades fisiológicas y de la composición química (s, 14, 23, 29, 42, 57, 58, 72, 84, 119), ya que en algunos casos se ofrece una estrecha relación entre el consumo de

DIAGRAMA 6. Conversión de energía química a energía utilizable y calor a través de la respiración acoplada.



FUENTE: Introducción a la ciencia de los alimentos. O.R. Ferreira.
Ed. Reverte S.A. Barcelona España (1982).

carbohidratos y la velocidad respiratoria. Por ejemplo, los chicharos recolectados experimentan una notoria pérdida de sabor dulce a causa de la rápida oxidación de sacarosa. (153)

Así como también, la degradación oxidativa de los lípidos probablemente ocurra solo durante la germinación de ciertos tipos de semillas oleaginosas (higuera, calabaza, aceituna). Mientras que las proteínas se usan con frecuencia como sustratos de la respiración de los vegetales ya sea bajo condiciones de falta de nutrientes o durante la germinación de las semillas donde es su reserva principal. En algunos tejidos se observa una continua destrucción y resíntesis de proteína, debida entre otros factores, a que durante el crecimiento existe un continuo cambio en el contenido de enzimas. (153)

Y si aúncado a ésto se considera que los carbohidratos pueden convertirse a lípidos o aminoácidos y los lípidos a su vez interconvertibles a aminoácidos (con dificultad los lípidos pueden transformarse en carbohidratos) ello hace más difícil todavía explicar la variación de la actividad respiratoria.

8.1.1 Evaluación respiratoria.

La evaluación respiratoria podría determinarse con las pérdidas que experimenta el sustrato, la cantidad de O_2 admitida, la de CO_2 expelida, de calor producido y de energía desarrollada, pero prácticamente no puede llevarse a cabo por:

a) No existe una relación estequiométrica en la oxidación biológica seguida de la elevación de temperatura que pudiera ser un indicador de la tasa respiratoria.

b) Es difícil definir las pérdidas de sustrato, debido a las variaciones en cambios absolutos del peso seco, requiriéndose para ello de análisis químico directo. Sin embargo, como se había mencionado, el sustrato (materia seca) rara vez es el único sustrato consumido durante la respiración. También pueden servir, el almidón, compuestos pectícos, lípidos y proteínas.

c) Como la reacción para oxidar la cantidad de agua liberada sería en un medio acuoso, resulta indetectable la escasa cantidad de agua producida.

d) La energía desarrollada tampoco se cuantifica porque las diferentes formas de ella que se producen en el proceso no pueden ser determinadas fácilmente por métodos instrumentales. (12)

Quedando así en última instancia la determinación de CO_2 y O_2 . La literatura considera que con dichas determinaciones es posible evaluar la naturaleza del proceso respiratorio, mediante el designado cociente de respiración (CR) :

$$\text{CR} = \frac{\text{CO}_2 \text{ producido.}}{\text{O}_2 \text{ consumido.}}$$

8.1.1.1 Cociente respiratorio (CR).

La mayoría de las veces el CR es determinado manométricamente, midiendo los cambios de volumen de un gas confinado en un sistema cerrado.

Al punto que, el CR proporciona una guía cualitativa para detectar cambios en los trayectos metabólicos y la aparición de sistemas de emergencia (descarboxilasas y oxigenasas no respiratorias). Así el CR elevado indica el aumento de la descarboxilación o disminución de carboxilación. (145, 147, 151, 153, 141)

A continuación se exponen diversos estudios realizados para detectar CR alterados por las bajas temperaturas y poderlos utilizar como indicadores de sensibilidad al frío, lo cual no parece congruente con la literatura:

Sugiene Platenius (1942), que la suboxidación (inhabilidad del tejido para obtener o utilizar suficiente O_2) fué un factor en el daño por frío; aunque, concluye que tanto la velocidad de respiración como el CR, en pepinos mantenidos a 0.5 °C, no mostraron desviaciones comparadas con los que permanecieron a 10 o 24 °C, lo cual podría sugerir una velocidad anormal en la actividad respiratoria. (23)

No obstante, MacI y Janer (1942) registran un incremento de tres veces más en el CR de pepinos almacenados por 3 semanas de 2.2 a 3.3 °C, pasando el CR más allá de la unidad. (23)

De la misma manera Eaks y Morris (1956) muestran que en pepinos variedad Cubit, almacenados a 15 °C tienen un CR ligeramente menor a 1 y a los 12 días tiende a 1. la misma tendencia es observada cuando se someten a 5 °C y 0 °C , pero después de los 7 días a 0 °C el CR fué mayor de 1. comprobado por dos técnicas diferentes probadas en tejido y fruto intacto; argumentando que Platenus pudo no haber notado la desviación debido a la frecuencia en sus observaciones.

Los mismos investigadores correlacionan el incremento en el CR con el tiempo en el que comienzan los primeros síntomas visibles de daño por frío, como picadura en la superficie. (23)

Eaks (1952) observa un CR mayor de 1. en limones a 0 o 5 °C por 4 semanas; la determinación la efectuó 7 horas después de transferidos a 20 °C, a las 24 horas los niveles de CO₂ y O₂ regresaron a su nivel normal sugiriendo que fué un daño reversible y ligero, pero después de 8 semanas a 0 °C o 12 semanas a 0 y 5 °C los niveles no alcanzaron las concentraciones iniciales. (134)

Así, Ivanova (1958) encuentra un incremento gradual en el CR durante el periodo de maduración y envejecimiento de limones en almacenamiento a bajas temperaturas. Esto podría ser relacionado con las respuestas normales en donde la tasa respiratoria es mayor en frutos maduros que la registrada en frutos jóvenes. (125)

Por otro lado. Smock y Hulme (1958) proponen que el daño

en los tejidos de manzanas y peras ocurre por un disturbio metabólico, denotado por un CR mayor de 1. (140)

Comparando la velocidad de respiración, Dilley, Mac Lean y Loxey (1963), a 20 °C encuentran que en manzanas Red Delicious después de 5 meses a 0 °C en atmosfera natural y controlada (3% CO₂, 3% O₂), el fruto en la primera tiene una capacidad elevada para respirar anaeróbicamente (CR mayor de 1), es decir produce gran cantidad de CO₂ y consecuentemente está en avanzada senescencia con respecto a las almacenadas en atmósfera controlada. El CR vario de 0.67 a 0.97 en los frutos mantenidos a 20 °C por 2 semanas. (155)

Murata y Hu (1966), en apoyo a las investigaciones anteriores, observan un CR menor de 1 en plátano, en un cierto tiempo de exposición a bajas temperaturas. Después de prolongar el tiempo, el CR es mayor de 1 y asocian este cambio a la respuesta general del fruto y no como una característica de la sensibilidad al frío. (141)

Ogata et. al (1968), hallan que en pimientos a 1.1 °C durante 3 semanas, el CR disminuyó debido a un incremento en la absorción de O₂ (coincidiendo con la época en la que el caliz se tornó color pardo) y sostienen que si el CR aumenta con el tiempo a bajas temperaturas se puede asociar con cambios degenerativos, lo cual concuerda con lo afirmado por Beevers (1961) quien argumenta que la acumulación de ácidos orgánicos es causado por la senescencia del fruto mas que a su sensibilidad al frío. (141)

Iwatta et. al (1969) en cítricos Natsudaikai encontró un CR más elevado y mayor descarboxilación del piruvato a 1.1 °C que en los almacenados a 5.1 °C.

Otros investigadores como Fidler (1968), Fidler y Coursey (1969), y Flatenius (1942), no confirmaron el ascenso del CR con el enfriamiento. (121)

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el CR presenta el mismo patrón de comportamiento en condiciones naturales que a baja temperatura, siendo el tiempo el factor decisivo en el efecto producido es decir, al prolongarse el periodo de almacenamiento, da como resultado la aparición de los primeros síntomas visuales de daño por frío, tal como lo demuestran Eais y Morris (1956), (23) quienes consideran el CR como índice de la desviación del proceso normal respiratorio en donde la utilización proteica o disturbio enzimático pudo haber ocurrido o bien algún sustrato metabolizado en la respiración, acuerdo al que llega Arkinson (1977), (121). No obstante, en su artículo reconocen que el comportamiento respiratorio normal asociado con la baja temperatura podría ser por sí mismo un síntoma de una primera anomalía y puede no ser un factor relacionado al desarrollo de los síntomas visuales, así pues, el daño por frío podría encontrar su fundamental causa en el metabolismo celular.

Por otra parte, al no ofrecer los investigadores las condiciones precisas a las que sujetaron su material de experimentación, sus resultados corren el riesgo de prestarse a

ser considerados como datos aislados y en consecuencia el CR no puede utilizarse ni siquiera como indicador del sustrato, menos para detectar cambios en los trayectos metabólicos y ni se dice como indicador de la sensibilidad al frío, ya que influyen varios factores, entre los que destacan los siguientes:

- Durante la transferencia de una temperatura baja a otra más elevada, los frutos u hortalizas exhiben un incremento en la velocidad respiratoria, por lo tanto se modifica el CR.

- El CR es un valor promedio de la contribución de cada sustrato.

- Un CR igual a 1 podría indicar la oxidación de carbohidratos como sustrato; el CR mayor de 1, un sustrato oxigenado, ácido orgánico o que ocurra fermentación en el tejido por su inhabilidad para metabolizar O_2 (ej. en la germinación de semillas) y el CR menor de 1, que se utilice un ácido graso - puede indicar una oxidación incompleta deteniéndose por ejemplo a nivel de ácido succínico o de otros intermediarios, así como también puede denotar que el CO_2 producido se utilice en otros procesos de síntesis como en la formación de oxaloacético y málico a partir de piruvato y CO_2 .

- El CR depende de la obstrucción a la entrada de O_2 , temperatura, presencia de microorganismos, y fijación de CO_2 durante periodos oscuros. Goddard y Meeuse (1950) encontraron que a medida que aumentaba la concentración de CO_2 en la atmósfera también aumentaba su fijación. Corroborado después por

Allentoff (1954) que identifica la fijación de ^{14}C en ácido málico y 3 aminoácidos: glutamina, ácido aspártico y alanina.

(148, 147, 141, 141)

Por lo tanto, para deducir si el CR podría utilizarse como indicador de la naturaleza respiratoria y relacionarla con la sensibilidad al frío, debe ser confirmada con un profundo estudio bioquímico en donde se contemplen los factores que se hicieron alusión.

9. LA NATURALEZA DE LOS SUSTRATOS RESPIRATORIOS Y ALGUNOS EFECTOS POR TEMPERATURAS BAJAS.

Puesto que la alteración en la composición estructural de la membrana mitocondrial cuya importancia deriva de su función y la naturaleza del mecanismo de control bioquímico que ejerce (el cual contribuye al balance de los procesos que se llevan a cabo en su interior), es la directamente responsable de los desórdenes en frutos, hortalizas y cereales, manifestados por el "síndrome del enfriamiento", no puede vacilarse en reconocer que tal síndrome puede estar relacionado con la velocidad respiratoria y ésta a su vez con el desajuste de sus diversos sustratos.

Por ende, se procede a examinar algunos efectos de la baja temperatura en la naturaleza de:

I. Lípidos

II. Proteínas

III. Carbohidratos

Así como también sus respectivas vías oxidativas, profundizando principalmente en lo concerniente a carbohidratos por ser los sustratos más frecuentemente empleados en la respiración de vegetales.

9.1 Lípidos.

Desde hace varias décadas se han consagrado un número considerable de estudios acerca de los lípidos, debido a su notable participación en la actividad metabólica vegetal.

Una definición apropiada del término es motivo de controversia. Con frecuencia en la literatura lo definen como: " Grupo de sustancias orgánicas heterogéneas originadas en la célula, insolubles o escasamente solubles en agua, solubles en solventes orgánicos no polares (éter, cloroformo y benceno " es decir, como compuestos hidrofóbicos. (14, 15).

A pesar de que los bioquímicos insistan en conservarla, tal definición resulta ambigua, puesto que solo está basada en la solubilidad y por lo tanto puede abarcar una gran cantidad de sustancias muy diversas. Además, la concepción de solubilidad que se menciona es relativa porque está en función del estado en el que se halle el tejido vegetal; en otras palabras, la extracción de lípidos puede llevarse a cabo directamente en materia biológica seca con algún solvente muy apolar v. gr. éter de petróleo (Huelin y Gallon, 1951). Pero, en células vivas o material intacto muchos compuestos lipídicos (particularmente fosfolípidos) están enlazados con proteínas por enlaces no covalentes que aunque no son muy fuertes, si son numerosos y dada ésta razón es imposible obtener ese complejo lipídico mediante una extracción simple con solventes apolares. Por el contrario, una forma de extorcer dicho complejo es empleando mezclas de

solventes polares como cloroformo-metanol (Folch et. al, 1957) o con éter-isopropanol (Nichols, 1964).

En atención a lo cual, sin desear prescindir de la susodicha definición, puede admitirse otra que limite el concepto, como: " derivados reales o potenciales de los ácidos grasos o sustancias estrechamente relacionadas " propuesta por Chapman (1969). De ésta manera, incluye en forma exclusiva a las grasas, ceras y sustancias afines.

9.1.1 Contenido en frutos y hortalizas.

En términos generales, se puede establecer que los frutos y hortalizas contienen bajo contenido de lípidos, expresado en porcentaje oscila entre el 0.1 y 1 %, por ejemplo: la uva tiene 0.2 %, platano 0.1 %, manzana 0.06 %. aunque existen excepciones, como el aguacate y aceituna que tienen en promedio un 20 %.

9.1.2 Variación del contenido lipídico.

El contenido de lípidos, además de la especie-variedad depende entre otros factores, de la distribución dentro del mismo vegetal y del periodo de desarrollo.

En lo que respecta a la variedad, Schwob (1951) demuestra la variación en los porcentajes de lípidos en pulpa de aguacate, como se muestra en la tabla 9.1.2.1.

TABLA 9.1.2.1 Contenidos de lípido y agua en pericarpio de algunas variedades de aguacate.

VARIEDAD	CONTENIDO DE AGUA		CONTENIDO DE LÍPIDO	
	% PESO FRESCO	% PESO FRESCO	% PESO FRESCO	% PESO SECO
Wagner	72.47	16.77	67.46	
Lula	73.89	13.60	53.30	
Taylor	76.89	12.61	53.38	
Eagle Rock	78.06	12.18	55.12	
Winslowson	78.08	13.02	58.31	
Linda	78.74	12.32	58.66	
Collinson	79.44	11.55	53.80	
Maldin	82.37	6.34	35.37	
Scheidt	82.55	7.21	39.97	
Traco	83.53	5.91	35.61	
Simondo	87.88	6.63	37.12	
Pollock	85.05	4.77	31.39	

FUENTE: Biochemistry of fruits and their products. A.C. Hulme. Vol. 1. Academic Press. N.Y. (1970).

Al comparar las distintas variedades puede apreciarse que el contenido de lípido es inversamente proporcional al contenido de agua, pero esta aseveración no es del todo convincente ya que no se mencionan datos sobre el estado de madurez.

Salvo algunos estudios como el de Vogel (1958) y Dolendo et. al (1966) que experimentaron con frutos de aguacate, varios investigadores han encontrado que durante su desarrollo existe un incremento substancial en el contenido de lípidos. entre ellos, De Luca Terroine (1920) observando la acumulación de lípido en pericarpio de aceituna durante su desarrollo diferencia cuatro periodos:

1. El primero correspondiente al máximo crecimiento del fruto en el árbol, sin ninguna detectable acumulación de lípido.
2. Un periodo de acumulación de lípidos, en donde el contenido se incrementa de 7.8 a 62.3 %.
3. Una fase estacionaria.
4. Un periodo regresivo.

Esto dio pie a ser objeto de amplios estudios y más tarde experimentando con otra especie, Crombie y Hardman (1958) al examinar los aspectos cuantitativos en coco, observan que la acumulación de lípidos en pericarpio se inicia después de la primera fase de intenso incremento o sea cerca de 19 semanas después de la polinización. La acumulación la detectan por el incremento brusco en el contenido de lípido relativo (expresado en por ciento del peso fresco), pero el incremento en peso absoluto registrado por el fruto sigue un comportamiento lineal durante el periodo acumulativo.

Por tal efecto, Descais (1961) a diferencia del estudio en aceituna por De Luca Terroine, distingue en pericarpio de coco únicamente dos fases:

1. Una fase de intenso crecimiento del fruto sin un significativo depósito de lípido en las células.
2. Una fase acumulativa lineal durante el estado final de desarrollo, en donde tal acumulación de lípidos se detiene con el inicio de la senescencia del fruto.

Así mismo, se indica que en cada período, la suma del porcentaje de lípido y agua en el fruto fresco permanece constante, lo cual sugiere que el lípido reemplaza progresivamente al agua en la célula. Esto apoya a lo sustentado con anterioridad (1959) por Davenport y Ellis en donde mediante una examinación microscópica advierten la aparición de lípidos en las células del mesocarpo del fruto de aguacate durante su desarrollo, revelando la existencia de acumulación de gotitas de aceite en las vacuolas con el consiguiente desplazamiento del agua que es empujada hacia el exterior. Este hecho después (1964) fué confirmado por Duran-Grande y Tamayo en estudios histológicos detallados de diferentes partes de la aceituna, en el cual describen el concurso de las gotitas de aceite en células del mesocarpo, señalando que en frutos maduros la mayor parte de la célula está ocupada por una vacuola aceitosa que rodea al núcleo y al citoplasma contra las paredes de la misma.

Luego entonces, comprender el complicado proceso metabólico, más en lo concerniente en materia vegetal, está condicionado por la explicación correcta de la interdependencia de un sin número de factores inherentes a la especie-variedad por lo que los datos falsos tomados en su conjunto conducen a planteamientos que interfieren para dilucidar tanto el proceso fisiológico como a su vez el efecto en el mismo cuando los vegetales son sujetos a condiciones adversas, por ejemplo: la baja temperatura.

9.1.3 Importancia.

Parece en realidad que todo compuesto de un organismo juega un papel importante y aunque se encuentren en bajo contenido como es el caso de los lípidos, no les resta importancia.

Los lípidos son esenciales en el metabolismo y aun cuando no esté esclarecida su entera participación, se sabe son importantes en el mantenimiento de la textura, sabor, color, etc.

Para revisar los lípidos de tejidos vegetales, cabe la posibilidad de agruparlos de acuerdo a su función en:

- | | | |
|---------------------------|---|----------------------------|
| 1. Reserva | { | Triacilglicéridos |
| 2. Estructurales | { | Fosfolípidos |
| | | Glicolípidos |
| | | Lipoproteínas |
| 3. Protección | { | Ceras |
| | | Ácidos cutículos |
| 4. Contribución sensorial | { | Sabor { aceites esenciales |
| | | Color { Pigmentos |

9.1.4 Lípidos de reserva.

Los lípidos de reserva, conocidos también como: acilglicéridos, lípidos neutros o sin carga, son los compuestos más abundantes en la naturaleza encontrándose en las células de almacenamiento de los vegetales. (144, 150).

Su función se basa en sus propiedades químicas: se consumen por oxidación, ayudando de esta manera a proporcionar energía para los procesos vitales. (150).

Dentro de los lípidos de reserva se encuentran por su abundancia primeramente los triglicéridos, nombre empleado por tradición pero en la actualidad no es muy aceptado y en su lugar se usa su equivalente, triacilglicéridos.

Este tipo de lípidos están constituidos de una composición variable de ácidos grasos como puede apreciarse en el concentrado de la tabla 9.1.4.1

Esta composición influye sobre sus propiedades funcionales como por ejemplo, la temperatura de solidificación, tendencia a la oxidación, etc. (144).

En la tabla 9.1.4.1 se puede observar como el punto de fusión del ácido graso saturado es directamente proporcional al tamaño de su cadena de átomos de carbono, disminuyendo su solubilidad a medida que aumenta la longitud de la cadena y el peso molecular. Mientras que el punto de fusión del ácido graso insaturado es menor a medida que aumenta el grado de insaturación

y su sensibilidad a las reacciones de oxidación, así mismo es mayor, cuanto más insaturado sea el ácido.

Además, los puntos de fusión de los ácidos grasos insaturados son menores que los de ácidos grasos saturados para una misma longitud de la cadena de átomos de carbono.

Por lo cual se deduce que a temperaturas de 20 a 25 °C, los ácidos grasos saturados indicados permanecen en estado sólido (grasa) y los ácidos grasos insaturados son líquidos (aceite)

(144, 159).

TABLA 9.1.4.1 Composición y propiedades de algunos lípidos contenidos en especies vegetales.

ACIDO GRASO		PUNTO DE FUSION °C	FORMULA	GIRASOL	TRIGO	MAIZ	ALBODON	CENTENO	CAJAHUATE
SATURADO									
Láurico	C _{12:0}	44.2	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH						
Mirístico	C _{14:0}	54.4	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH		2			6	
Palmitico	C _{16:0}	63.0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	6	18	6	23	11	9
Estearico	C _{18:0}	69.4	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	4	7	2		4	6
Aracídico	C _{20:0}	76.0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH		2			2	
INSATURADO									
Oleico	C _{18:1}	13.0	C ₁₇ H ₃₃ COOH	31	16	44	32	18	51
Linoleico	C _{18:2}	-5.0	C ₁₇ H ₃₁ COOH	57	51	48	45	35	26
Linolénico	C _{18:3}	-11.0	C ₁₇ H ₂₉ COOH		4			7	

FUENTE: Principles of Food Science. 11. Food microbiology and biochemistry. G. Borgstrom. Mc. Millan London; Química de los alimentos. D.S. Sadui. Ed. Alhambra México (1982).

Estas propiedades podrían explicar más claro los estudios de Lyon, descritos anteriormente en la respuesta de la mitocondria a bajas temperaturas, en donde se argumentaba que las

mitocondrias de especies vegetales resistentes contienen mayor cantidad de ácidos grasos insaturados de lípidos estructurales que las especies vegetales sensibles, entonces se requieren de temperaturas más bajas para solidificar los ácidos grasos insaturados, por lo que si las mitocondrias sensibles contienen más ácidos grasos saturados que las mitocondrias resistentes, puede ocurrir un grado de solidificación mayor en las sensibles.

Consecuentemente, la susceptibilidad de los vegetales al daño por frío al parecer está determinada por la composición de los ácidos grasos. Sin embargo, tal composición varía en función de otros factores, además de considerar la especie-variedad, se hallan los que se mencionan enseguida:

a) Procedencia de la especie-variedad.

Experimentando con aceite de oliva, Eder (1951) demuestra que la composición de los ácidos grasos de una especie-variedad en particular se modifica dependiendo de su procedencia, como puede observarse en la tabla 9.1.4.2.

Los resultados indican que un elevado contenido de ácido oleico ($C_{18:1}$) está acompañado por bajos valores tanto de ácidos grasos saturados como de ácido linoleico ($C_{18:2}$).

Algunos otros investigadores (Montefredine y Laporta, 1963; Violante, 1964), han informado que la proporción de ácidos grasos insaturados en aceite de oliva se incrementa a medida que la temperatura del medio disminuye. Por lo que el porcentaje de

ácido oleico es más elevado en los aceites del norte de Italia que en los aceites del sur. La misma observación se hace cuando comparan las aceitunas cosechadas en las montañas con las de las llanuras, o según la temporada, por ejemplo: las cosechadas en Noviembre son más ricas en ácido oleico que aquellas en etapas tempranas como Septiembre.

TABLA 9.1.4.2 Composición de ácidos grasos de aceites de oliva de diferentes países.

ORIGEN	% TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS					
	SATURADOS			INSATURADOS		
	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 20:0	C 18:1
California	Trazas	7.0	2.3	0.1	85.8	4.7
Italia	Trazas	9.4	2.0	0.2	24.5	4.9
España	0.2	9.5	1.4	0.2	81.6	7.0
Tunez	0.1	14.7	2.47	0.3	70.3	12.2
Israel	0.5	10.0	0.22	0.1	77.5	8.6

FUENTE: Biochemistry of fruits and their products. A.C. Hulme. Vol. 1. Academic Press N.Y. (1970).

b) Composición de la atmosfera.

Por lo que se puede estimar, cambia la composición de los lípidos de los frutos almacenados después de cosechados de acuerdo a la composición del medio que los circunda.

A manera de ejemplo se cita lo detectado por Macial (1965) al exponer los frutos de aguacat a varias presiones parciales de Oxígeno usando bolsas de polietileno con números

variables de perforaciones en donde encuentra que el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue más alto en los lípidos de los frutos en atmósferas más oxigenadas.

c) Período de desarrollo.

También influye en la composición de los ácidos grasos, el período de desarrollo del fruto, tal como ha sido demostrado en pericarpio de coco por Crombie y Hardman (1958). En el comienzo del período de crecimiento, los lípidos del fruto son ricos en ácido linoleico (24.4 % del total de ácidos grasos) y pobres en ácido oleico (solo 4.0 %); sin embargo, al final del período de desarrollo, el ácido oleico representa el 73.5 % del total de ácidos grasos, disminuyendo considerablemente el porcentaje de ácido linoleico. Esto muestra que los lípidos de reserva (triacilglicéridos) que se van acumulando poseen una composición marcadamente diferente de los lípidos iniciales (presumiblemente los constituidos por fosfolípidos).

Por otra parte, Mazliak y Pommier, 1963; Neubeller, 1963; Igh y Hulme, 1965 y Meigh et. al, 1967, encontraron en parénquima interno de manzana una síntesis preferencial del ácido linoleico en el momento de la elevación climática o sea, cuando el fruto adquiere la madurez comestible.

Durante la maduración de mango, Matoo (1967) observa que los principales ácidos grasos presentes al inicio fueron el palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico y al final

del proceso los ácidos grasos no saturados aumentaron más que los saturados. En cambio, Grosbois y Mazliak (1969) al experimentar con plátano el comportamiento es contrario es decir, la maduración está acompañada por una desaparición parcial de los ácidos grasos insaturados.

Sin embargo, en términos generales la biosíntesis de ácidos grasos durante el proceso de maduración es el mismo: los ácidos grasos poliinsaturados ($C_{18:2}, C_{18:3}$) disminuyen progresivamente en porcentaje, mientras los monoinsaturados ($C_{18:1}, C_{18:1}$) son producidos activamente.

d) Temperatura.

El patrón de comportamiento de la variación de ácidos grasos, parece invertirse en vegetales sujetos a bajas temperaturas, tal como se advierte en el estudio de Kane, Marcellin y Mazliak (1978), en donde pretenden observar los cambios de los ácidos grasos durante 28 días paralelo a la identificación de los primeros síntomas del daño por frío, por efecto de la misma temperatura y el tiempo de exposición, utilizando como material de experimentación mitocondrias del fruto de mango (Mangifera indica L.) cosechados en Malí (Africa) en estado de madurez sazón. ...

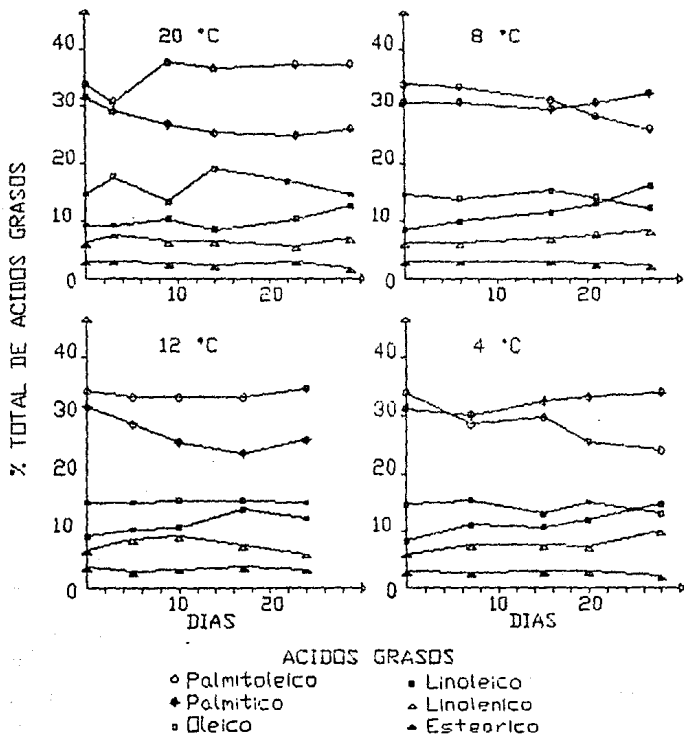
Resultando que los ácidos grasos de 16 átomos de carbono presentan el cambio más marcado en relación con el desarrollo del daño por frío.

Como puede observarse en las graficas 8, a 20 y 12 °C aumenta el palmitoleico (C_{16:1}) y disminuye el palmitico (C_{16:0}), manteniendose los demás acidos casi sin variación: en cambio, a 8 y 4 °C ocurre la desaturación de oleico a linoleico a los 20 y 25 días, respectivamente, mientras que el acido palmitoleico disminuye y el palmitico aumenta (contrariamente a lo presentado a temperaturas mayores) esto sucede a los 18 y 4 días respectivamente, lo cual a su vez guarda una estrecha relación con el inicio de los síntomas de daño por frío (mango sin sabor dulce, epicarpo sin brillo, manchas pardas).

En otras palabras, a temperaturas bajas los acidos grasos poliinsaturados (C_{18:2}, C_{18:3}) de los vegetales, tienden a incrementarse, en tanto los monoinsaturados (C_{16:1}, C_{18:1}) disminuyen progresivamente en porcentaje.

Hasta ahora la información directa disponible para plantas superiores es poca, más aun aquella con respecto al efecto de la baja temperatura, por lo que se ofrece una pauta a seguir sobre futuras investigaciones.

GRAFICAS 8 Variación de la composición de ácidos grasos en frutos de mango, durante su almacenamiento a diferentes temperaturas.



FUENTE: Plant Physiol., 61: 634-638 (1978).

9.1.5 Lípidos estructurales.

Contemplados con características de estructurales se hallan los fosfolípidos, los cuales contienen dos grupos acilo y en lugar del tercero un grupo fosfato cuya estructura principal es el fosfato de diacilglicerol o ácido fosfatídico.

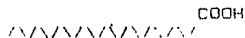
Los fosfolípidos conforman la unidad de membrana tanto la celular o plasmalema (capa más externa del citoplasma) o tonoplasto (membrana interna que limita a la vacuola); así como las estructuras de membranas dobles, por ejemplo: las del núcleo, cloroplasto o mitocondria.

Dichas membranas no tan solo "contienen", sino también controlan selectivamente el transporte al interior o al exterior, nutrientes, productos de desecho, reguladores de crecimiento, etc.; varias de esas sustancias son fuertemente polares como carbohidratos, aminoácidos o iones como sodio y potasio; inclusive pueden pasar de una concentración más baja a otra más elevada. La manera como pueden atravesar, puede explicarse en base a las proteínas y cadenas de fosfolípidos que forman la membrana. Es decir, en la bicapa está disuelta una molécula proteínica enrollada de tal forma (la configuración está en función de la secuencia de aminoácidos a lo largo de su cadena) que sus partes hidrofobas se dirigen hacia afuera, al acercarse una de las mencionadas sustancias, por ejemplo un ion sodio, si la proteína es la adecuada para manejarlo, lo acepta en su

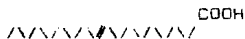
interior polar, así oculto en la envoltura hidrófoba lo pasa al otro lado. Esta proteína debe moverse libremente dentro de la membrana.

Aunque las moléculas de la bicapa se encuentren alineadas no deben estar encerradas en una red cristalina rígida eso sucedería solo en el caso de que las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos fueran todas saturadas. dado que la estereoquímica específica de los ácidos grasos tiene una importancia vital, en sí la configuración cis o trans va a determinar el acomodo de las moléculas.

Las cadenas de ácidos grasos saturados están extendidas linealmente en zigzag por los ángulos de enlace tetraédricos, pudiendo yuxtaponerse.



La configuración trans de ácidos grasos no saturados estará en forma similar a la anterior.



Pero la configuración cis de ácidos grasos no saturados, presentan un doblez en el doble enlace:



lo cual no permite el acomodo mutuo ni con cadenas saturadas y es precisamente esta ultima configuracion la que se encuentra en la naturaleza.

Y como no se hallan solo cadenas de acidos grasos saturados, los acidos grasos no saturados " rompen " la superposicion lo suficiente como para que la membrana permanezca semiliquida a temperaturas fisiologicas. (150)

Esta podria ser la explicacion mas convincente de la tolerancia de las mitocondrias al frio.

Como se recordara en las diversas investigaciones citadas en lo referido a la respuesta de las mitocondrias a las temperaturas bajas, se encontro un incremento en acidos grasos insaturados. Esto es apoyado por estudios mas recientes (1985), en donde se evidencio los elevados niveles de acido linoleico en ciertos fosfolipidos de variedades e incluso cultivares mas tolerantes al frio (41), lo cual conservara de acuerdo a lo propuesto la semi-liquidez de las membranas a temperaturas bajas.

Estudiando la composicion de los lipidos en frutos de papino. Fishwick, Wright y Galliard (1977), demostraron que la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina eran los constituyentes principales de los fosfolipidos (aproximadamente 84 %) (22). Similar patron de resultados obtuvieron Abdelkadar y colaboradores en tejido de manzana (alrededor del 71.5 %) (23). Asi como tambien, Mazliak, 1967; Mazliak y Justin, 1957; Ueda , 1970 y Minamide y col. 1970, 1972; sobre la misma especie. (14).

Según cita Fantastico (1979), Yamaki y Uritani (1972), indican que la liberación de fosfatidiletanolamina de la fracción de la membrana mitocondrial, ocurre en respuesta al almacenamiento a bajas temperaturas y esto a su vez origina cambios físicos y químicos en la estructura mitocondrial.

Los mismos investigadores (1969) al considerar que los ácidos grasos de longitud de cadena más corta, tal como el ácido laurico y quizás el ácido isopalmitico, declinan cuando los camotes (variedad Okinawa No. 100) son dañados por frío; sugieren que el incremento en los ácidos grasos insaturados por las bajas temperaturas, podría deberse principalmente a la liberación de lípidos de la membrana conteniendo en comparación tales ácidos grasos de cadena corta. (20)

Por otra parte, Kuiper (1985), denota que el "hardening" (ver punto 12) en los vegetales por las temperaturas bajas, se establece por un nivel elevado de fosfolípidos en especial de fosfatidilcolina (de los más insaturados fosfolípidos), bajando la relación esteroles/fosfolípido. También postula que todas estas propiedades podrían contribuir a una alta fluidez de la membrana y una disminución del crecimiento a la temperatura límite. (21)

A propósito de los glicolípidos, ellos están constituidos por las moléculas de: aminoalcohol insaturado de cadena larga llamado esfingosina, alcohol, ácido graso y algún carbohidrato, muy frecuente en vegetales la D-galactosa. Los glicolípidos más sencillos encontrados en los vegetales son los

glicosilidicilgliceridos.

La cantidad de glicolipidos que se detectan es muy variada, como puede apreciarse en los siguientes informes.

Según cita Fennema, en los estudios de composición del tejido de manzana por Abdellader A.R., Catesson A.M., Mazliak P., Thibaudien A. y Tremolieres A. (1968) encuentran solo vestigios en pulpa, mientras que en piel la cantidad es mayor, los resultados se resumen en la tabla 9.1.5.1.

TABLA 9.1.5.1 Composición de lípidos del tejido de manzana.

LIPIDOS	PULPA			PIEL
	ENTERA	MITOCONDRIA	MICROSONAS	
Lípidos totales	(% de lípidos totales en cada parte)			
Lípidos neutros	24	10	+	85.6
Glicolipidos	Trazas	Trazas	Trazas	5.5
Fosfolípidos	75	90	+	9.5
Fosfolípidos	(% de fosfolípidos totales en cada parte)			
Fosfatidilinositol	1.6	5	14.7	18.2
Fosfatidilcolina	32.6	45	39.5	33.8
Fosfatidilserina	Trazas	7	7.6	9.5
Fosfatidilglicerol	6.9	3	12.2	Trazas
Fosfatidiletanolamina	38.7	35	25.6	18.2
Difosfatidilglicerol	3.8	-	6.1	8.7
Fosfatídico (ácidos)	16.3	5	-	11.6

FUENTE: Introducción a la ciencia de los alimentos. O.R. Fennema. Ed. Reverté Barcelona España (1962).

Pero en los estudios de Peng y Geisman (1976) en pepinos, indican todo lo contrario, encontrándose por cada 100 gr. de peso seco, 138.7 mg. de lípido, de los cuales los glicolipidos, lípidos neutros y fosfolípidos representaron: 83.2 mg. (60 %),

41.1 mg. (26.6 %) y 14.4 mg. (10.4 %), respectivamente (25,28). Por otro lado, Kinsella (1971) también con pepino como material de experimentación halló la relación 39, 15 y 49 % comparada con el estudio de Feng y Geisman (26). Similares resultados a los de Kinsella son observados por Fishwick M.J., Light A.J. y Galliard T. (1977) en pepino cuya relación fué de 32.1, 23.4 y 45.5 % (27).

Estas discrepancias entre la misma especie podrían deberse a que utilizaron diferentes variedades de pepino o posiblemente de cultivares, estado de desarrollo, así como las diferencias debidas al ambiente.

En lo que respecta a las lipoproteínas son compuestos de lípidos y proteínas conjugadas. Son las proteínas estructurales más importantes de algunas membranas (144, 145), se han encontrado en la membrana celular (en realidad esta, se considera un complejo lipoproteico), en el núcleo y en las laminillas del cloroplasto. (144)

Son solubles en agua y como grupo prostético (componente adicional no aminoácido que va unido a la molécula de proteína) contienen lípidos como la lecitina y la cefalina. (151)

Algunas plantas disponen de otras sustancias lipídicas tales como galactolípidos y sulfolípidos (27, 153). Dichos compuestos se sabe poseen propiedades tensoactivas (144), se encuentran en cloroplastos y diversas regiones de la célula metabólicamente activa pudiendo ser cofactores importantes en algunas reacciones

degradativas o de síntesis. (145)

Varios galactolípidos han sido identificados en pericarpio del fruto de pimienta (Mc Arthur et. al, 1964) y en frutos de hiedra (Grosbois, 1968), éstos últimos se han empleado en medicina como expectorante.

En estudios con cloroplastos de frutos de pimienta, Mc Arthur (1964) ha notado un descenso súbito en los porcentajes de galactolípidos y sulfolípidos al tornar los frutos de verde a rojo.

Además, los principales fosfolípidos de membranas lipoproteicas de vegetales están caracterizados por un elevado contenido de ácido linoleico. Sin embargo, los fosfolípidos mitocondriales son más ricos en ácido linoleico que los microsomales del tejido parenquimatoso de manzana (Thibaudin et. al, 1968).

A pesar de todo, la preparación de membranas lipoproteicas de células vegetales aun presentan numerosos problemas técnicos.

En consecuencia, el análisis de lípidos de las membranas de frutos esta todavía dirigida a fracciones de organelos celulares obtenidos por centrifugación diferencial.

9.1.6 Lípidos de protección.

En cuanto a los compuestos lipídicos acumulados en las membranas epidérmicas exteriores (cutícula) de los vegetales.

se encuentran las ceras y los ácidos cutínicos. Ambos desempeñan un papel importante en el control de la transpiración, como órganos de protección ante la pérdida de agua, ataque de microorganismos y de insectos, así como amortiguador de daños mecánicos. (134).

En lo que se refiere a las ceras, Kiegan, 1953; Eglinton y Hamilton, 1967 y Mazliat, 1968, se han dedicado a revisarlas en frutos.

Es necesario aclarar que la expresión "ceras naturales" no solo se refiere a las ceras-ésteres (combinación de una molécula de un alcohol monohidroxilado de cadena larga y una de ácido graso), sino también a los hidrocarburos parafínicos, olefinas, ácidos grasos, cetonas, alcoholes (primarios, secundarios), aldehídos, etc. (135). Los compuestos fundamentales presentes en ceras cuticulares tienen largas cadenas en el intervalo de C_{20} a C_{30} .

Una propiedad importante de las ceras es que son sólidas (estructura paracrística) a temperatura ambiente, demostrada con técnicas de difracción de Rayos X (Lueger, 1948), mientras que líquidas y moldeables en caliente. Su punto de fusión está entre los 40 y 100 °C.

La composición química de las ceras varía según la especie. V. gr., la manzana tiene 33 % de parafina comparada por 1.2 % de parafina en uva; en las fracciones cerosas de la manzana se encuentra un 19 % de alcoholes en tanto la uva 62.9 %. (136).

Huelin y Gallop (1951) y Mazliak (1967) han detectado el incremento de ceras durante el desarrollo del fruto y el subsecuente almacenamiento. Las ceras fueron sintetizadas despues de los estados iniciales de formacion del fruto y la cantidad de cera total (por fruto) se incrementa durante el periodo de crecimiento, siguiendo un comportamiento sigmoidal.

Durante el almacenamiento despues de cosechados, inicialmente hay una acumulacion de ceras en la superficie de la epidermis, hasta un máximo nivel seguido por un decremento de la cera en peso por unidad de área. Similarmente se ha encontrado cambios cuantitativos en ácidos grasos y ceras también en epicarpo de manzana. El periodo de crecimiento está acompañado por una síntesis preferencial de ácidos grasos saturados, mientras que el periodo de maduración está marcado por una acumulacion de ácidos grasos insaturados, en ceras (Thibaudin y Mazliak, 1967). La senescencia de frutos, despues de la elevacion climaterica va de la mano con un decremento en ácidos grasos insaturados en las ceras y esto sugiere que los compuestos de cadena corta resultan de la degradacion de ceras, lo cual podría contribuir en la formación de productos volátiles por el fruto (Mazliak, 1967). Esto puede notarse en los análisis de productos volátiles de manzana en donde se muestra que muchos compuestos son similares a los productos de degradacion de los ácidos grasos (Paillard, 1965).

Mazliak y Fournier-Mard (1967) examinaron los cambios en

la composición de la cera de las manzanas durante los periodos de crecimiento y almacenamiento. Cuando los frutos aún están en el árbol, la fracción de cera aumenta con mayor rapidez que el aceite. Pero al ser sometidos a bajas temperaturas el aceite aumenta, permaneciendo constante la cera. Durante el almacenamiento en frío ocurre la degradación de la cera y se reduce la cantidad de aceite. (141)

Con relación a las formas cutínicas puede mencionarse que constituyen la parte principal de las cutículas vegetales, aunque su naturaleza química ha permanecido oscura. La dificultad que se presenta al analizar esta sustancia se basa en su poca solubilidad en muchos solventes orgánicos. Cuando es abundante en funciones oxigenadas secundarias, los constituyentes de cadena larga de la cutina están adheridos firmemente por polimerización cruzada en la membrana.

De los ácidos cutínicos identificados por Eglinton y Hunneman (1968) en la cutícula de manzana, con un mayor porcentaje están los ácidos trihidroxi-monobásicos 27 %, seguido de ácidos monohidroximonobásicos 26 %, ácidos monobásicos 1.16 %, ácidos dibásicos 0.62 % y ácidos vic-dihidroxi-dibásicos 0.24 % (24). Así confirman sus trabajos previos pero además detectan la presencia de los ácidos 18-hidroxi-octadecanoico y 10,18-dihidroxi-octadecanoico.

9.1.7 Lípidos de contribución sensorial.

Por lo que respecta a los lípidos que contribuyen sensorialmente en los vegetales se pueden mencionar a los aceites esenciales, al sabor/aroma, y a los pigmentos tales como carotenoides, al color.

Aunque se encuentren en ínfima cantidad los lípidos que participan en el sabor característico de los tejidos vegetales, tienen una marcada influencia. En algunos casos están disueltos en terpenoides formando los aceites esenciales. (144, 153).

Los terpenos son hidrocarburos oxigenados, cíclicos o lineales, con o sin dobles ligaduras, su estructura básica está formada por cadenas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno, $\text{CH}_2 = \underset{\text{CH}_3}{\text{C}} - \text{CH} = \text{CH}_2$).



Existen compuestos de gran importancia biológica que tienen características terpénicas como la coenzima Q requerida en las reacciones de oxidación efectuadas en la mitocondria de la célula. (157).

Los aceites esenciales se pueden encontrar distribuidos en los diversos órganos del vegetal como son las hojas, raíces, flores y frutos (en la epidermis de frutos cítricos o hojas de menta) de diferentes especies o aun en toda la planta.

La importancia biológica de los aceites esenciales se lo ha

atribuido a que por ser aromáticos actúen como atrayentes de insectos polinizadores, además de actuar como hormonas en la polinización, reguladores de la transpiración o por ser desecho de actividades metabólicas.

La composición del aceite esencial puede cambiar de acuerdo con la época de cosecha, situación geográfica o debido a algunas modificaciones genéticas sufridas en el interior de las células.

Al llegar a éste punto, resulta oportuno mencionar que cuando los frutos u hortalizas son almacenados a temperaturas bajas no adecuadas, ocurre un rompimiento de los tejidos lo cual podría generar cambios autolíticos catalizados por enzimas endógenas entremezcladas, que causan la descomposición hidrolítica y oxidativa de los lípidos. La oxidación de los ácidos grasos insaturados principalmente los ácidos linoleico y linolénico (son los predominantes además del ácido palmítico) pueden producir compuestos carbonilos responsables de las características deseables o indeseables del sabor y aroma. (35, 93, 133)

Por último, con respecto a los carotenoides, existen en el tejido vegetal junto con la clorofila disueltos en lípidos o formando complejos con proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, dando lugar a diferentes colores según su interacción.

En las plantas los carotenoides tienen dos funciones principales: actuar como pigmentos accesorios (filtros de luz) en la fotosíntesis y ser los responsables del colorido de las

flores y frutos. Algunos investigadores opinan que tienen además una función como protectores de las enzimas de la célula.

En términos generales forman un grupo de compuestos liposolubles de color amarillo, naranja y rojo, constituyendo uno de los pigmentos más importantes. Se encuentran en plátanos, papas, duraznos, zanahorias, melocotones, tomates, chiles, trigo, maíz u otros. (14).

Los productos vegetales almacenados a temperaturas bajas pueden aumentar o disminuir los pigmentos dependiendo de varios factores como: la temperatura, grado de madurez y la variedad, entre otros; lo cual demuestran los estudios de Ezell y Wilcox (1952) al notar una disminución de pigmentos carotenoides totales en batatas " Nancy Hall " a temperaturas bajas; mientras que los frutos de tomate " Improved Harbot " pequeños e inmaduros almacenados a 10 °C y luego transferidos a 21.1 °C tardaron más en color amarillo que otros más grandes. (14). Esto debido a que las temperaturas bajas favorecen la destrucción de licopeno.

9.2 Proteínas.

Sin duda, las proteínas junto con los ácidos nucleicos son el grupo de máxima importancia de polímeros biológicos, debido a que son las responsables de casi todas las propiedades vitales.

Es bastante difícil distinguir unas de otras sobre todo en

materia vegetal y solo se han aislado algunas parecidas que contienen gran número de compuestos individuales de alto peso molecular.

Todas las proteínas poseen la misma estructura básica: son polímeros que por hidrólisis completa producen una mezcla de unidades repetidas, los aminoácidos, los cuales se encuentran ligados entre sí por enlaces peptídicos.

9.2.1 Contenido en frutos y hortalizas.

Las proteínas no se encuentran en gran proporción y aunque colaboran como reserva energética esta es mínima durante la respiración, al parecer solo se requieren en condiciones de escasez de alimento o durante la germinación de las semillas, como anteriormente se mencionó para el caso de lípidos.

Cabe hacer notar que por las inherentes bajas concentraciones y la interferencia de los contenidos vacuolares, principalmente compuestos fenólicos y ácidos orgánicos, los estudios de proteínas en frutos han sido impedidos, pero tales problemas ya están siendo ampliamente superados por el desarrollo de nuevos materiales y técnicas analíticas, aún cuando en estas últimas también deban considerarse factores como el medio químico, temperatura y las manipulaciones mecánicas durante la preparación del tejido, entre otros.

En términos generales, las proteínas representan menos del

1 % (peso fresco) de los tejidos vegetales, sin embargo, se detectan variaciones significativas entre las diversas especies vegetales.

Así, las hortalizas frescas aunque no constituyan una fuente importante de proteínas, en promedio (referido a peso fresco) los chicharos contienen 6.5 %; espárragos, judías, papas blancas 2 %; lechugas y zanahorias 1 %. Puede resultar interesante citar por ejemplo a las papas que aun cuando contengan dicho porcentaje, se consideran proteínas de calidad, por su relativamente elevado contenido de lisina y triptófano (aminoácidos esenciales).

El contenido proteico de frutas tales como: cacahúes, ciruela, cerezo, chabacano, durazno, fresa, granada, limón, lima, manzana, mango, melón, membrillo, naranjo, papaya, pera, piña, sandía, toronja, toronja y uva, es por lo regular menor al 1.5 %; con un índice ligeramente superior están la aceituna, aguacate, dátil y grosella, con excepción de la nuez de castilla que contiene 13.7 %. La tabla 9.3.1.1 muestra el porcentaje de proteína expresado como nitrógeno total $\times 6.25$, para algunos frutos (Watt y Merrill, 1963).

TABLA 9.2.1.1 Contenido de proteína en frutos expresado como nitrógeno total x 6.25.

FRUTO	% HUMEDAD	% PROTEÍNA
Aguacate (<i>Persea gratissima</i>)	74.0	2.1
Albaricoque (<i>Prunus armeniaca</i>)	85.3	1.0
Cereza		
Agria (<i>Prunus cerasus</i>)	83.7	1.2
Dulce (<i>Prunus avium</i>)	80.4	1.3
Ciruela (<i>Prunus sp.</i>)	79-87	0.5-0.8
Dátil, seco (<i>Phoenix dactylifera</i>)	22.5	2.2
Durazno (<i>Prunus persica</i>)	89.1	0.6
Frambuesa		
Roja (<i>Rubus strigosus</i>)	84.2	1.2
Negra (<i>Rubus occidentalis</i>)	80.8	1.5
Fresa (<i>Fragaria hybrids</i>)	89.9	0.7
Granada (<i>Punica granatum</i>)	82.0	0.5
Grosella		
Europea (<i>Rubus nigrum</i>)	84.2	1.7
Roja y blanca (<i>Rubus hybrid</i>)	85.7	1.4
Grosella blanca (<i>Rubus grossularia</i>)	88.9	0.8
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	83.0	0.8
Higo (<i>Ficus carica</i>)	77.5	1.2
Lima (<i>Citrus aurantifolia</i>)	89.3	0.7
Limón (<i>Citrus limonia</i>)	87.4	1.2
Mandarina (<i>Citrus hybrid</i>)	87.0	0.8
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	91.7	0.7
Manzana (<i>Malus sylvestris</i>)	84.6	0.2
Melón Cantaloup (<i>Cucumis melo</i>)	91.2	0.7
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	86.0	1.0
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	88.7	0.6
Pera (<i>Fyrus communis</i>)	83.2	0.7
Piña (<i>Ananas comosus</i>)	85.3	0.4
Plátano (<i>Musa sapientum</i>)	75.7	1.1
Sandía (<i>Citrullus vulgaris</i>)	92.6	0.5
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)		
Verde	93.0	1.2
Maduro	95.5	1.1
Toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	68.4	0.5
Uva		
Americana (<i>Vitis labrusca</i>)	81.6	1.3
Europea (<i>Vitis vinifera</i>)	81.4	0.6

FUENTE: Biochemistry of fruits and their products. A.C. Hulme. Vol. 1. Academic Press N.Y. (1970).

En lo concerniente a granos de cereal, en donde la humedad aproximada es del 12 %, el porcentaje oscila entre el 6 y 20 %, como se aprecia en la tabla 9.2.1.2.

TABLA 9.2.1.2 Contenido de proteína en cereales.

Cereal	Porcentaje de proteínas
Trigo	
Durum (muy duro)	13.5 - 15
Coeun (duro)	12 - 13
Club (blando)	7.5 - 10
Cebada	12 - 13
Centeno	11 - 12
Avena	10 - 12
Maíz (dentado)	9 - 10
Arroz	7 - 9

FUENTE: Apuntes de Tecnología de alimentos. A. Jaime. FESC-UNAM.

En general, los cereales y hortalizas con un contenido de proteínas entre 2.9 y 8.2 % poseen notables cantidades de proteínas de reserva, mismas que serán utilizadas durante el proceso respiratorio.

9.2.2 Variación del contenido proteico.

Resulta oportuno denotar que aunque se dispongan de los datos mencionados en el punto anterior, el contenido de proteínas es inexacto, dado que en el análisis químico habitualmente se

obtiene multiplicando el contenido de proteínas por un factor, en este caso es 6.25. Dicho factor es el resultado de dividir 100 entre el porcentaje de nitrógeno total considerado como proteína y que corresponde aproximadamente al 16 %, cuando se sabe que el factor depende del tipo de proteína en cada producto, por ejemplo, en general para lipoproteínas y glucoproteínas es de 23.8 ($100/4.2$) y para protaminas de 3.33 ($100/30$).

Algunas fuentes indican el factor respectivo para cada especie, como en la tabla 9.2.2.1 se presenta.

No obstante, deben aplicarse los factores correctos previamente verificados por técnicas bioquímicas para separar las proteínas, fraccionarlas y determinar el nitrógeno proteico total, ya que existe cierta cantidad de nitrógeno no proteico en los tejidos vegetales. Se reporta hasta un 70 % de nitrógeno de origen no proteico en algunas variedades de manzana y dos tercios de nitrógeno en forma de aminoácidos libres en papa. También pueden encontrarse en los vegetales: asparagina, glutamina y otros compuestos nitrogenados como ácido β -aminobutírico en limón, uva, frambuesa, papa, aguacate; colina en uva, papa, berenjena; glutatión en cítricos, uva, papa; ácido piperólico en manzana, cereza, aguacate; dopamina en plátano; S-metil L-cisteína sulfóxido en cebolla, col, nabo, entre otros.

Por otro lado, se advierte que la cantidad de nitrógeno proteico total puede variar ampliamente de acuerdo desde luego a la especie, la distribución en los diversos tejidos, estado de

TABLA 9.2.2.1 Factores utilizados en el análisis químico para determinar el contenido de proteínas en cereales, granos y semillas.

Cereales y Granos	Factor
Cebada	5.87
Maíz	6.25
Mijo	5.83
Avena	5.87
Arroz	5.95
Centeno	5.87
Sorgo	5.25
Trigo entero	5.70
Cáscara de trigo	6.31
Embrión de germen de trigo	5.89
Frijol	6.25
Soya	5.71
Cacahuate	5.46
Almendra	5.18
Pistache	5.30
Nuez	5.30
Nuez de Brasil	5.46
Semillas	Factor
Algodón	5.30
Melón	5.30
Calabaza	5.30
Ajonjolí	5.30
Girasol	5.30

FUENTE: Apuntes de Tecnología de alimentos. A. Jaime. FESC- UNAM.

desarrollo del vegetal, área de crecimiento, estación del año, prácticas culturales e influencias del medio.

Los resultados de Robertson y Turner (1951) así lo demuestran. Ellos indican en manzanas 'Granny Smith', maduras, provenientes del mismo árbol de Australia, en diferentes tamaños seleccionados, que la variación de nitrógeno total fué de 45 al

87 %. También encontraron diferencias Kenworthy y Harris (1963) en manzanas ' McIntosh ', ' Red Delicious ' y ' Golden Delicious ' dependiendo de la estación del año y la región de crecimiento.

La ubicación de proteína en el fruto, todavía no ha sido estudiada extensivamente y podría ser interesante desde el punto de vista de almacenamiento refrigerado, para saber si existe translocalización de proteína como respuesta del vegetal a dichas condiciones. En base a lo limitado de los datos disponibles, se puede admitir que la concentración de proteína tiende a ser más elevada en el pericarpio que en el mesocarpio o porción corecáulica. Hulse (1936) halló de 100 a 150 mg/100 gr. en la pulpa y de 320 a 360 mg/100 gr. en la cascara de manzana de semilla Bramley s. dependiendo del estado de desarrollo. La misma tendencia encuentra Hansen (1955) en peras maduras Anjou. Pero en el estudio de Bain (1955) en naranjas maduras, las cantidades presentes son iguales aproximadamente en ambos tipos de tejidos.

Durante el desarrollo del fruto, el cambio neto progresivo de nitrógeno proteico es evidente en algunas especies como: aguacate (Rowan et. al, 1967); tomate (Davies y Cocking, 1965 ; Spencer, 1965; Rowan, 1967), manzana y pera (Frenkel et. al, 1968), mango (Matoo, 1968; Ghai G. y V. Mod. 1972), pero no así en plátano según Sacher (1966), aunque más tarde se reporta que sí ocurre en plátano (Smillie et. al, 1969). Cuando los frutos son almacenados a temperaturas bajas el comportamiento es similar, como lo demuestra Turner (1949) durante el

almacenamiento refrigerado de manzanas.

Al parecer la capacidad de síntesis de proteína en los frutos se detiene al iniciar la senescencia.

Aparte, considerando que por fortuna la base principal para síntesis de proteínas: $DNA \rightarrow RNA \rightarrow Proteína$, es la misma en todos los organismos estudiados y los frutos no son la excepción. Entonces, la existencia de evidencias directas de cambios progresivos en expresión genética reflejada en los aspectos anatómico y morfológico durante el desarrollo, podrían ser concomitantes a los cambios proteicos en las células, especialmente en las enzimas específicas contenidas. Si así resultare, los patrones metabólicos durante la vida de un fruto podrían considerarse como un desarrollo continuo de procesos ordenados, programados de acuerdo a la información genética específica contenida en la célula, reaccionando de acuerdo a la influencia del medio tanto interno como externo.

Sin embargo, durante el desarrollo del vegetal, el patrón bioquímico es más difícil de reconocer que los aspectos de expresión genética.

Por lo tanto, para evaluar el patrón bioquímico es necesaria alguna estandarización de métodos para determinar y expresar el contenido de proteína de los frutos, contemplando los fundamentos que provean datos verdaderos y evitar complicaciones por la variabilidad de la muestra, así como los cambios en el contenido de humedad durante el almacenamiento prolongado. Luego, sobre

éste supuesto, establecer una metodología para investigar el efecto por la baja temperatura, teniendo en cuenta todos los factores citados.

9.2.3 Importancia.

Aunque las proteínas no representen una fuente relevante como reserva energética, su importancia reside primordialmente no solo como componentes de las estructuras de membrana (nuclear, citoplasmica, mitocondriaca), las cuales toman parte en la determinación y mantenimiento de la organización celular sino porque también incluye a las enzimas involucradas en el metabolismo, durante el desarrollo incluyendo crecimiento, maduración y en general vida poscosecha del vegetal. Por ende, las proteínas están relacionadas con varios aspectos fisiológicos: la respiración, actividad enzimática, proceso de maduración, así como todos los problemas de senescencia de los frutos.

En lo que se refiere a la participación de las proteínas en las estructuras de membrana es poco conocido su arreglo y funcionamiento debido a las dificultades que se presentan en el aislamiento y análisis. Siendo uno de los inconvenientes su baja solubilidad en medio acuoso y la alta afinidad por los lípidos. Y en cuanto al efecto por la baja temperatura, en especial sobre las membranas mitocondriales, ya se ha indicado.

Con relación a su función como enzimas puede decirse que su acción catalítica de estas grandes moléculas proteicas es regular los procesos vitales de frutos y hortalizas, tales como la respiración y la maduración.

En cuanto a los aminoácidos, generalmente no toman parte en actividades metabólicas tan importantes como el ciclo de Krebs o la glucólisis, como es el caso de los ácidos orgánicos, porque la función especial de los aminoácidos en la célula es la transformación y metabolismo del nitrógeno, no de la energía. Sin embargo, intervienen en varias vías metabólicas entre las que se encuentran la síntesis de azúcar por la vía del glicolato donde participan la glicina y serina.

También se ha sugerido que tanto el aspartato como el malato y oxaloacetato pueden actuar como los ácidos C_4 transportadores de carboxilo en la vía fotosintética de Hatch y Slack.

La metionina está relacionada con la síntesis de etileno, como con las reacciones de transmetilación en la síntesis de compuestos metilados (timina, fenoles metilados, alcaloides, lignina). El triptofano es precursor del ácido indolacético, un regulador del crecimiento. La prolina incorporada en proteínas y luego convertida en hidroxiprolina toma parte en las ligaduras internas por enlaces débiles que coadyuvan a establecer la estructura terciaria de las proteínas. Y entre otros, los ácidos glutámico y aspártico, participan en la formación de ácidos nucleicos (ver diagrama 9).

9.2.3.1 Q_{10} .

En la mayoría de las enzimas, su actividad se muestra sensible a la temperatura, como se sabe aumenta de 2 a 4 veces por cada 10 °C de aumento en la temperatura (Q_{10}), así mismo dicha actividad disminuye conforme la temperatura se reduce.

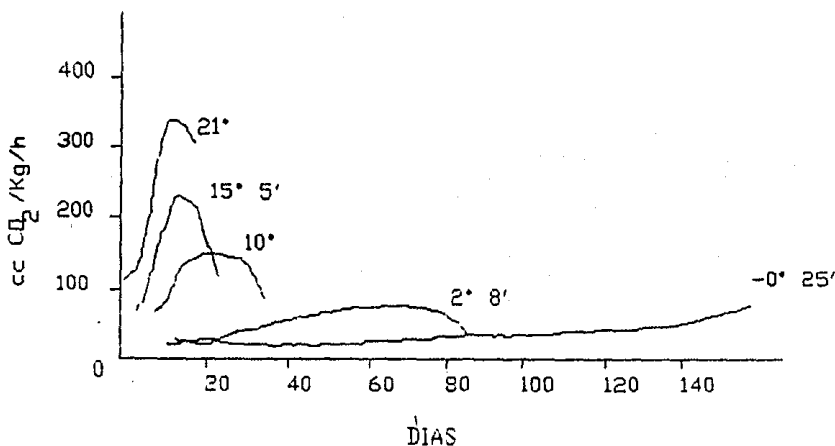
El término de Q_{10} se utiliza para determinar el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción, expresado como una relación de dos velocidades a dos temperaturas con una diferencia de 10 °C entre ellas:

$$Q_{10} = \frac{\text{velocidad de reacción a } T + 10 \text{ }^{\circ}\text{C}}{\text{velocidad de reacción a } T}$$

es decir, un valor de $Q_{10} = 2$ indica que la velocidad de reacción se duplica por cada 10 °C de aumento dentro del intervalo de temperatura en el que la enzima es estable.

Por consiguiente, la actividad enzimática se considera determinante en la vida de los productos vegetales, tal como lo demuestran Kidd y West (1927) al estudiar el efecto de la temperatura en el patrón respiratorio de frutos de pera, mostrado en la gráfica 9.

GRAFICA 9. Efecto de la temperatura en el patron respiratorio de frutos de pera.



FUENTE: Preenfriamiento de frutos y hortalizas. U.A.CH. (1981).

Se observa que al disminuir la temperatura, se abate el ritmo respiratorio y en consecuencia se retardan los cambios inherentes a la maduración.

Sin embargo, Jones (1942), Lewis (1956) y Platenius (1942) sugieren que el daño por frío resulta de la desorganización en la sincronización de las diversas etapas de la compleja secuencia respiratoria, al detectar coeficientes elevados de temperatura (Q₁₀) a bajas temperaturas, utilizando como material de experimentación papaya, papa, tomate y pepino.

De esta manera Lyons y Raison (1970), utilizan mitocondrias sensibles de fruto de tomate verde maduro (Lycopersicon esculentum Mill., cv. Grosse Lisse), de raíz de camote (Ipomoea batatas L., cv. White Maltese) y de fruto de pepino (Cucumis sativus L.), así como mitocondrias resistentes de papa (Solanum tuberosum L., cv. Sebajo), de brote de coliflor (Brassica oleracea L. var. botrytis) y de raíz de remolacha (Beta vulgaris L.) y las someten a temperaturas en el intervalo de 25 a 1.5 °C. Observan que al descender la temperatura de 25 °C a 9 a 12 °C, el valor del Q_{10} es de 1.3 a 1.5, pero al bajar la temperatura a 1.5 °C, las mitocondrias resistentes mantienen un Q_{10} de 1.7 a 1.9 mientras que las mitocondrias sensibles experimentan una desviación del Q_{10} de 2.2 a 6.3. Estos comportamientos en mitocondrias sensibles son compatibles con la hipótesis establecida: " La fase de cambio que ocurre en la membrana mitocondrial es el resultado del efecto físico de la temperatura en algunos componentes de la membrana ".

Las mitocondrias de tomate y camote muestran un Q_{10} de 1.4 a 1.6 al transferirlas de 25 °C a 9 ó 12 °C, al llegar a los 9 °C se incrementa el Q_{10} a 6.1 (tomate) y 6.3 (camote), pero en el pepino a pesar de ser también sensible, se observa un patrón algo diferente, subitamente a los 12 °C ocurre un decremento en la respiración ($Q_{10} = 2.2$), comparado con las dos especies anteriores. Aproximadamente a 8 °C sucede un abatimiento de la respiración en pepino, camote y tomate de 60, 15 y 20 %

respectivamente, mientras que a 2 °C, el abatimiento es de 61 a 63 % en las tres especies.

De igual forma Fantástico demuestra que dependiendo de la susceptibilidad relativa de los vegetales a bajas temperaturas, la respiración puede aumentar o disminuir.

Por otro lado, considerando que la cinética de reacción de las enzimas está en función de la temperatura y cada enzima posee una temperatura óptima para su máxima actividad, se espera que a cierta temperatura algunas enzimas se activen y otras queden inoperantes.

De acuerdo a lo anterior, las temperaturas de 0 a 10 °C, pueden llevar consigo la modificación de la estructura proteica de la enzima. Tal como se revisó en el punto 6.2, a bajas temperaturas ocurre la liberación de iones, si esta fuerza iónica resultara elevada puede inducir la desnaturalización de las proteínas, o bien puede dar lugar a un efecto inhibitorio o activador de la enzima. Además, los puentes de hidrógeno se favorecen a temperaturas bajas por lo que la enzima puede interaccionar más fácilmente con moléculas similares o con agua, lo que ocasiona que el sitio activo se pueda modificar.

Esto podría explicar la existencia de una temperatura óptima bifásica, como es el caso de lo reportado para la invertasa del fruto de mango, estudiada por Chattpar y colaboradores (1971), quienes informan que la enzima fué bastante activa a 0 y a 37.2 °C, proponiendo que algunas enzimas pueden ser activadas

" in situ " al ser expuestos los vegetales a temperaturas bajas.

La causa de los cambios en los niveles de sacarosa y almidón que se efectuaron en los tejidos de los frutos de mango dañados por frío, reportados por Mattoo y Modi (1969) puede ser debida a la disminución de la actividad de la amilasa que fue de 2 a 3 veces y de la invertasa que aumento a más del doble. Los mismos investigadores sugieren que el ablandamiento de los tejidos durante el desorden fisiológico causado por la baja temperatura puede ser posiblemente el resultado del incremento en la actividad de la pectinesterasa, lo cual conduciría a la disolución de los componentes pectínicos insolubles.

Así pues, todo lo citado ha requerido de una laboriosa lucubración, pero aún es insuficiente el conocimiento sobre la función de las proteínas.

Estimando necesaria la revisión de los tipos de proteínas para dar una idea más precisa de su participación, se expone a continuación de manera somera.

De acuerdo a su composición las proteínas pueden ser:

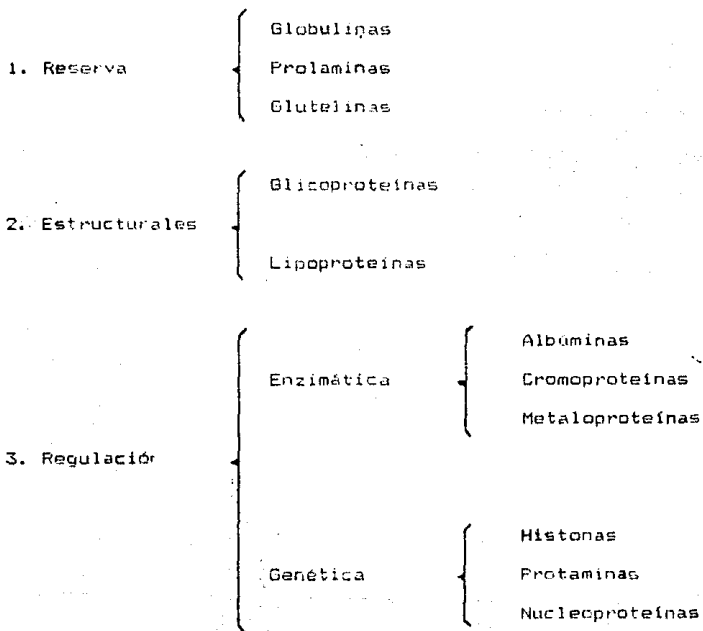
- A. Proteínas simples
- B. Proteínas conjugadas

Las proteínas simples son compuestos que por hidrólisis dan exclusivamente aminoácidos y comprenden a las albúminas, prolaminas, glutelinas, histonas y proteminas.

Mientras que las proteínas conjugadas contienen además de su cadena peptídica un componente privado de aminoácidos denominado

grupo prostético, adherido a la cadena por medio de sales o enlaces covalentes. Se agrupan de acuerdo a su núcleo prostético en glicoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, cromoproteínas y metaloproteínas.

Aunque, las proteínas de tejidos vegetales también pueden ser agrupadas de acuerdo a su función en:



9.2.4 Proteínas de reserva.

Para prevenir el aporte de sustrato de naturaleza proteica en el proceso de producción energética en la mitocondria de la célula vegetal, se dispone de las globulinas, prolaminas y glutelinas, las cuales presentan las siguientes características:

Las globulinas además de ser importantes como reserva, podrían situarse en el renglón de enzimas. Son insolubles o poco solubles en agua aunque solubles en soluciones salinas diluidas. Representan la fracción abundante en soya y cacahuete.

Se les designa con el nombre de prolaminas a las proteínas que por hidrólisis producen considerables cantidades de prolina y amoníaco. Son insolubles en agua, pero solubles en etanol del 50 al 90 %. Con frecuencia se hallan de reserva en las semillas como: gliadina en trigo, hordeína en cebada y zeína en maíz. Aunque también algunas prolaminas como la papaina (papa) participan encimáticamente.

La reserva proteica más importante en los vegetales la constituyen las glutelinas. Son insolubles en solventes neutros, pero solubles en disoluciones diluidas de ácidos y bases. Principalmente se encuentran en las semillas de los cereales como por ejemplo: la glutenina en trigo y oricenina en arroz.

9.2.5 Proteínas estructurales.

Como componentes principales de membrana se encuentran las lipoproteínas y se piensa que las glicoproteínas pueden actuar de igual manera.

Las lipoproteínas ya han sido descritas previamente en la parte de lípidos estructurales.

En cuanto a las glicoproteínas, también llamadas mucoproteínas, son combinaciones de proteína y carbohidrato, normalmente un polisacárido de hexosa o de pentosa. En vegetales no se han detectado proteínas asociadas con algún derivado nitrogenado, como la galactosamina en animales.

Las proteínas en las semillas tienen primordialmente misión estructural ya que forman parte de las paredes celulares y membranas.

9.2.6 Proteínas regulatorias.

Este rubro puede ser dividido en dos: las proteínas que actúan enzimáticamente (las albuminas, cromoproteínas y metaloproteínas) y aquellas que se presume actúan como inhibidores o reguladores de genes (histonas, prolaminas y nucleoproteínas).

Las albúminas son proteínas simples solubles en agua y en soluciones salinas diluidas. muchas de ellas tienen propiedades

enzimáticas como por ejemplo la β -amilasa de la cebada y papa.

Las cromoproteínas cuya única propiedad en común es que tienen varios pigmentos como grupo prostético, comprenden un grupo de compuestos de gran diversidad, en donde casi todas son enzimas importantes. Son ejemplos, los complejos clorofila-proteína, flavoproteínas y proteínas con carotenoides.

Gran parte de las enzimas pertenecen al grupo de las metaloproteínas, debido a que necesitan un metal como activador, un buen ejemplo se halla en el estudio de las enzimas que participan en la respiración, como se examinará después.

Por otro lado, tanto las histonas como las protaminas, son solubles en agua y se caracterizan por su rico contenido de aminoácidos básicos, en especial de arginina y lisina, aunque las protaminas carecen de dos aminoácidos (tirosina y triptófano) y de azufre. A diferencia de las protaminas, las histonas no coagulan por calor, pero ambas se han encontrado en el núcleo de la célula por lo que se sospecha puedan estar relacionadas con los ácidos nucleicos teniendo un papel específico como inhibidores o reguladores de genes.

Además, las dos proteínas están asociadas de alguna manera con las nucleoproteínas, proteínas que por hidrólisis producen una proteína simple (a menudo protaminas o histonas) y un ácido nucleico. Sin embargo, existen serios inconvenientes para definir la existencia de las nucleoproteínas, puesto que se sustenta por un lado, que no ha sido demostrada ninguna asociación química

entre ácidos nucleicos y proteínas, por lo que se deduce que pueden ser solo un artificio producto de la técnica de aislamiento y contrariamente se asegura que el ácido nucleico y la proteína se unen para formar sistemas con estructuras y actividades funcionales muy complejas como ribosomas, pero que no se hallan unidos entre sí covalentemente. Mas bien se encuentran "adheridos" mediante fuerzas iónicas (atracción coulombica entre grupos cargados opuestamente), puentes de hidrógeno (el hidrógeno es repartido entre dos átomos electronegativos), interacciones hidrofobas e interacciones de Van der Waals (inducción mutua de momentos dipolares en grupos apolares). No obstante, la asociación no covalente de las macromoléculas en complejos supramoleculares es demasiado específica y de manera general muy estable, siendo el resultado de un "encaje" geométrico preciso o de una complementariedad entre los componentes.

Debido a que se han encontrado ribosomas, sitio donde ocurre la síntesis proteica, asociados a las membranas internas de las mitocondrias, resultaría interesante efectuar un estudio para indagar sobre su participación como reguladores o inhibidores genéticos y posteriormente observar su comportamiento ante la baja temperatura para ver si es factible guiar hacia el control de daño por frío genéticamente.

9.3 Carbohidratos.

Los azúcares ya sea libres o combinados con otros constituyentes, juegan un papel importante en la maduración y en las características sensoriales de los frutos u hortalizas.

El sabor agradable es logrado por el equilibrio en la proporción azúcar-acido, aparte de otros constituyentes frecuentemente glucósidos, los cuales imparten sabor amargo. Algunos S-glucósidos no tóxicos se encuentran en el rabano y semillas de mostaza y también son responsables del aroma; el color atractivo de muchos frutos es debido a ciertos derivados de azúcares, las antocianinas y la textura depende de los polisacáridos estructurales.

Son los compuestos más abundantes en la naturaleza. En el reino vegetal se sintetizan mediante el proceso de fotosíntesis, llegando a ser los principales compuestos químicos almacenadores de la energía radiante del Sol. En la fotosíntesis, el bióxido de carbono reacciona con agua para formar glucosa, con el consecuente desprendimiento de oxígeno.

La D-glucosa es la forma de carbohidrato más importante en el metabolismo. puesto que su oxidación completa a CO_2 y H_2O por medio de la glucólisis y el ciclo de Krebs concomitante a la fosforilación oxidativa (posteriormente revisados), genera moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) que son la base energética de los sistemas biológicamente activos. Por lo tanto, aunado con lo citado, constituyen una buena fuente de energía.

Los carbonhidratos denominados así por ser un grupo de compuestos orgánicos que contienen carbono, hidrogeno y oxigeno en general, en proporción 1:2:1, ha sido ampliado su concepto para incluir en él compuestos con nitrógeno y azufre, aquellos que no contienen los tres elementos base en dicha proporción estricta. Por esta razón, son definidos como polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas y sus derivados, así se agrupan en una categoría mucho más general. Al grupo de cetonas se les asigna el subfijo "ulosa" para distinguirlos de los aldehidos que tienen la terminación "osa".

9.3.1 Contenido en frutos y hortalizas.

El contenido de azúcar en los productos hortofrutícolas varía ampliamente, por ejemplo hay quienes reportan en el jugo de lima tan solo trazas (Swisher y Higby, 1961). en tanto otros se van hasta el extremo con 61 % (Biale, 1960). En muchos frutos el principal material de almacenamiento es azúcar pero en otros como el aguacate, consiste de lípidos . únicamente el 0.4% de azúcar está presente una vez cosechado (Biale, 1960).

El contenido de azúcar de una especie en particular puede variar considerablemente dependiendo de la variedad, las condiciones climatológicas durante su vida en la planta, así como por otros factores indicados en el punto 12.

Al examinar las tablas composicionales de alimentos, se observa que en general, los cereales son más ricos en almidón y

los más pobres en azúcares, mientras que los frutos son más ricos en azúcares libres y los más pobres en almidón. Referido a peso seco, las porciones comestibles de los frutos suelen contener entre el 80 al 90 % de carbohidratos. Las hortalizas ocupan una posición intermedia respecto al almidón y son más ricas en carbohidratos no aprovechables. Lo cual puede apreciarse en la tabla 9.3.1.1.

TABLA 9.3.1.1 Composición aproximada de carbohidratos de algunos productos hortofrutícolas.

	Frutos								
	Maíz (%)	Trigo (%)	Trigo blanco (%)	Soya (%)	Cacahuete (%)	Tuante (%)	Manzana (%)	Naranja (%)	Ciudad (%)
Monosacáridos									
D-fructosa	0.1-0.4	0.1		trazas		1.6	5	1.5	29
D-glucosa	0.2-0.5	0.1		trazas		1.2	2	2.5	15
Azúcares reductores				0-2	0.2	3.4	8	5	47
Oligosacáridos									
Sacarosa	1-2	1	3	5-7	4-5	1	3	4.6	2
Rafinosa	0.1-0.3	0.3	0.8	1-2					
Estaquiosa			2.5	3-5					
Otros		1-2	3.8						
Polisacáridos									
Almidón	64-78	59-61	35-40	0-2	4		0.6		0.7
Dextrinas		6-7	4	1-3	3				
Pectina						0.3	0.6	1.3	0.9
Pentosanas	6	5-6	8	4-5				0.3	2.0
Hemicelulosas	5-6	6	0-7	5-7	4	0.3	0.7	0.3	10.7
Celulosa	1	2	3	2-3	2-3	0.2	0.4	0.3	2.8
Agua (%)	16	14	11	10	2	93	84	86	3

FUENTE: Introducción a la ciencia de los alimentos. O.R. Fennema. Ed. Reverté (1982).

9.3.2 Variación del contenido de carbohidratos.

El contenido de carbohidratos varía conforme transcurre la maduración. Leley et. al. (1943) así lo demuestran en mangos 'Alphonso', en donde el almidón es hidrolizado por completo, formando sacarosa.

Similares resultados obtienen experimentando con algunas variedades de mango, Mukerjee (1957-59), Krishnamurthy et. al (1960), Modi y Reddy (1967), Mattoo (1969) y Mukerjee y Prasad (1972).

De la misma manera ocurre en otras especies como manzanas, plátanos y peras (Hulme, 1958). Un cambio menos notorio se percibe en albaricoques y duraznos (Deshpande y Salunkhe, 1964), así como en cítricos (Biale, 1960).

Sin embargo, cuando los frutos son expuestos al enfriamiento y sufren daño por frío, el patrón de comportamiento de los carbohidratos parece invertirse es decir, se observa disminución significativa en el contenido total de azúcares solubles, principalmente de sacarosa y menos descomposición del almidón en todas las etapas de maduración. Esto queda soportado por los estudios de Mattoo y Modi (1969) y Chattpar et. al (1971) quienes trabajaron con mango 'Alphonso'; Pantástico (1972) con pepinos, berenjenas, pimientos y tomates; Fidler (1968) con plátanos y Jones (1942) con papaya. Contrariamente a lo que sucede en limón según Miller y Schomer (1939).

9.3.3 Importancia.

En primer y destacado lugar, los carbohidratos en los vegetales son importantes porque representan una forma de almacenaje de la energía capturada a partir de la luz por el proceso de fotosíntesis.

Por su abundancia se consideran los principales generadores de energía en la célula metabólicamente activa y en consecuencia son necesarios para llevar a cabo una gran variedad de funciones biológicas. La gran mayoría de los compuestos orgánicos presentes en la naturaleza son derivados de carbohidratos, ya que aun la misma síntesis de proteína se realiza a través de aminoácidos, productos de la reacción entre carbohidratos y compuestos nitrogenados.

En segundo lugar, participan en la mejor utilización de proteínas y lípidos, sugiriendo ser los que primordialmente controlan el proceso metabólico.

Un mejor entendimiento del estudio de los carbohidratos, puede lograrse cuando de acuerdo a su función, son agrupados. Sin embargo, resulta complicado ubicarlos en un único lugar, puesto que comúnmente desarrollan una gran variedad de funciones en el metabolismo regidas bajo ciertas condiciones, pero en general participan como reserva, estructurales y en la contribución sensorial.

9.3.4 Carbohidratos de reserva.

Entre los carbohidratos que conforman la reserva energética del vegetal, principalmente se halla el almidón, seguido de fructanos, inulina y hemicelulosas.

El almidón normalmente se almacena en partículas muy pequeñas conocidas como gránulos. Debido a que los gránulos de almidón ejercen una presión osmótica muy baja, los vegetales pueden almacenar grandes cantidades de D-glucosa, el carbohidrato más importante en el metabolismo según se mencionó, en una forma muy accesible, sin romper el balance de agua de sus tejidos.

Químicamente el almidón, es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, amilosa y amilopectina. La amilosa, producto de la condensación de hexosas (D-glucopiranosas) forma largas cadenas lineales que pueden contener de 100 a 2500 unidades, con pesos moleculares que llegan hasta un millón de daltones. Los monosacáridos están unidos a través de enlaces glucosídicos α -D-(1-4) es decir, la amilosa es un α -D-(1-4) glucano, siendo la α -maltosa la unidad repetitiva de esta estructura química. Por otro lado, la amilopectina es otro α -D-glucano, que se diferencia de la amilosa por la presencia de ramificaciones y la forma molecular similar a un árbol en el que las ramas están unidas al tronco central por enlaces α -D-(1-6). Las ramificaciones se ubican aproximadamente cada 15-25 unidades de moléculas lineales de D-glucosa. El peso molecular de la amilopectina es superior al

millón, pudiendo alcanzar hasta 200 millones de daltones. En términos generales, los almidones contienen entre 17-27 % de amilosa y el resto de amilopectina, aunque existen algunos cereales como el maíz, sorgo y el arroz que tienen variedades denominadas " cereas " que están constituidas casi únicamente por amilopectina con un mínimo de amilosa. Existen otras variedades en las que la amilosa alcanza hasta 80-90 % del contenido total de almidón.

La inulina es una polifruktosana β -(2:1) importante como forma de almacenaje energético en raíces y tallos de plantas tales como, Dahlia y Helianthus tuberosum.

En las espigas de cereales se encuentran fructosanas del tipo de la inulina.

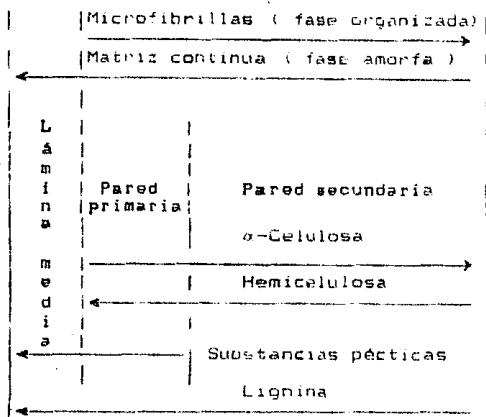
Las hemicelulosas son tratadas en el punto 9.3.5.

9.3.5 Carbohidratos estructurales.

Los carbohidratos que se caracterizan por constituir el tejido estructural, poseen las siguientes características: son polímeros que tienden a formar puentes de hidrógeno intermoleculares muy estables, son ligeramente solubles en agua y absorben poca cantidad de este líquido. Además, son poco reactivos dado a la elevada impermeabilidad que presentan a la mayoría de los agentes químicos.

Se encuentran distribuidos en la pared celular como se

indica a continuación (Northcote, 1952; Bidwell, 1987).



La celulosa renovada continuamente por el proceso de fotosíntesis, fundamentalmente es un homopolisacárido formado por moléculas de glucosa, es el más abundante en la naturaleza y que forma parte integral de todas las paredes de los tejidos de los vegetales. La más alta resistencia física que tiene se debe a sus enlaces β -D(1-4) y a su tendencia a formar puentes de hidrógeno intermoleculares entre cadenas adyacentes.

La celulosa y las sustancias pécticas constituyen las reservas lábiles de carbohidratos, que pueden servir también como fuentes potenciales de ácidos, azúcares y otros sustratos respiratorios, durante la maduración.

El término de sustancias pécticas se usa generalmente para

referirse a un grupo de polisacáridos vegetales en el cual el ácido D-galacturónico es el principal componente. La estructura básica de esta familia de compuestos está formada por moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1-4), en donde algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con grupos metilos o en forma de sal. Dentro de este grupo de carbohidratos se pueden distinguir varias clases: los ácidos pectínicos son los polisacáridos que tienen esterificado parte del ácido D-galacturónico como éster metílico, mientras que aquellos que no están esterificados se les conoce como ácidos pecticos. Las pectinas, por definición, son los ácidos pectínicos con diferente grado de esterificación; son solubles en agua y tienen capacidad de formar geles en presencia de ácidos, sales y azúcares. Las sustancias pecticas se encuentran primordialmente asociadas con la hemicelulosa en las paredes celulares y son más abundantes en tejidos suaves, como la manzana que tiene, en base húmeda, 0.5-1.6%; plátano, 0.7-1.2%; durazno, 0.1-0.2%; fresa, 0.6-0.7%; cereza, 0.2-0.5%; chicharo, 0.9-1.4%, mientras que, en base seca, la zanahoria, 6.9-1.4%; naranja, 12.4-28.0%; papa, 1.8-3.3% y tomate, 2.4-4.6%. En la cáscara existe distribución de las pectinas, dado que las que tienen un mayor grado de esterificación se encuentran en la parte más interna, en tanto las de menor grado se localizan en la periferia.

En cuanto a las hemicelulosas, se les conoce con este nombre

por ser un grupo bastante grande de polisacáridos, insolubles en agua pero solubles en álcalis que se encuentran asociados a las pectinas, a la celulosa y a otros polímeros. Su estructura química está compuesta por pentosas, como la D-xilopiranosas, formando grandes cadenas a través de enlaces glicosídicos β -D-(1-4), aunque ocasionalmente se encuentran moléculas de L-arabino-furanosas unidas al polímero por medio de los carbonos 2 ó 3 de la D-xilopiranosas. Otros carbohidratos asociados a este grupo de polímeros son los mananos, los glucomananos, los galactanos, los arabinogalactanos, el ácido urónico y las sustancias pécticas.

Después de la celulosa, la lignina es la sustancia biológica más importante tanto en términos de su cantidad como de su importancia estructural en los tejidos. Cabe aclarar que la lignina es de naturaleza fénolica macromolecular, pero acompaña a la celulosa y hemicelulosa como constituyente principal de las paredes celulares de los vegetales. La lignina es extremadamente difícil de estudiar como compuesto químico porque no puede extraerse fácilmente sin que sufra una fuerte degradación. Sin embargo, los monómeros de la lignina pueden ser aislados y se ha encontrado que son principalmente alcoholes derivados de sustancias fénolicas simples, como por ejemplo, alcoholes coniferil, sinapil y β -cumaril. Los monómeros de la lignina se arreglan al azar, aparentemente, mediante un complejo sistema de enlaces mutuos. La naturaleza de algunos de ellos es conocida

pero no lo es el arreglo integral de la lignina natural característica. La biosíntesis de lignina se lleva a cabo por la vía del ácido shikímico. Kozukue y Ogata (1971) observaron que dicho ácido aumenta rápidamente en semillas de pimiento mantenidas a 1.1 °C, llegando al máximo después de estar 4 días a esa temperatura.

9.3.6 Carbohidratos de contribución sensorial.

La mayoría de los carbohidratos que proporcionan características sensoriales en los frutos u hortalizas, pertenecen a la familia de los glucósidos.

Los glucósidos están formados por dos fracciones muy diferentes: un azúcar reductor y un no carbohidrato que se conoce con el nombre de aglucon, cuya unión se efectúa a través del carbono anomérico del azúcar. Los glucósidos se denominan O-glucósidos cuando existe un enlace entre el azúcar reductor y el hidroxilo de un alcohol o del fenol del aglucon. En un sentido estricto, los oligo y polisacáridos son también O-glucósidos, ya que su unión se efectúa por los hidroxilos de los correspondientes monosacáridos. Los N-glucósidos se forman por la unión del azúcar con un grupo amino. Los S-glucósidos se denominan también tioglucósidos por la presencia de azufre en su molécula. Muchos de ellos imparten sabor amargo y otros son tóxicos. Dentro de los glucósidos se encuentran los pigmentos

naturales, antocianinas y flavonoides.

Generalmente, las antocianinas son de color rojo y violeta, solubles en agua y están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están formadas por una molecula de antocianidina (aglucón) que se une a una fracción de carbohidrato a través de un enlace β -glucosídico. Entre todas las antocianidinas que se conocen actualmente (más de 100), las más importantes son la pelargonidina, la cianidina, la delphinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina. Es común que una misma antocianidina interaccione con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas; la pelargonidina es la que produce el color rojo escarlata de las fresas y algunas flores; la delphinidina se encuentra en las berenjenas y la cianidina en higos, cerezas, ciruelas y otros frutos.

Los flavonoides son pigmentos que abundan en la naturaleza, normalmente de color amarillo-naranja, tienen una estructura química muy similar a la de las antocianinas y por lo regular se encuentran juntos en los frutos ya que tienen el mismo camino biosintético. Entre los aglucosones de los flavonoides más importantes y comunes en la naturaleza se hallan la quercetina en cebollas, fresas y miel, la caempferina en fresas y la miricetina en uvas.

Recientemente, los flavonoides de la cascara de los cítricos han adquirido gran importancia ya que un derivado de la naringina, la chalcona de la neohesperidosa, tiene un poder

edulcorante de más de 1500 veces el de la sacarosa; se ha estado investigando bastante sobre dicho derivado ya que los edulcorantes artificiales (sacarina y ciclamatos) se han eliminado del mercado en muchos países y se requiere de un sustituto de tales productos.

10. VIAS OXIDATIVAS DE LOS SUSTRATOS RESPIRATORIOS.

Con lo anteriormente expuesto se puede tener una idea de como se ven o pueden verse alterados los lípidos, proteínas y carbohidratos, de acuerdo a su función, por la baja temperatura; sin embargo, el daño por frío en frutos u hortalizas debe analizarse desde una perspectiva más amplia es decir, en base a las reacciones que se efectúan en su interior. Las rutas metabólicas que siguen los diversos sustratos respiratorios pueden contemplarse a grosso modo en el diagrama 7. Además anexo a este, con la intención de ubicar los siguientes procesos oxidativos en el diagrama 8 se presentan las relaciones entre los intermediarios del metabolismo respiratorio y otras secuencias metabólicas.

10.1 Vía oxidativa de los lípidos.

Dentro del catabolismo del combustible biológico, los lípidos se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos individuales.

La operación probable aceptada acerca de la β -oxidación de ácidos grasos, exclusiva de las mitocondrias, reconoce el siguiente camino general, ilustrado en el diagrama 9.

Dado que el sin número de evidencias experimentales demuestran que la mayoría de los ácidos grasos contienen una cantidad par de átomos de carbono, el proceso parte de la

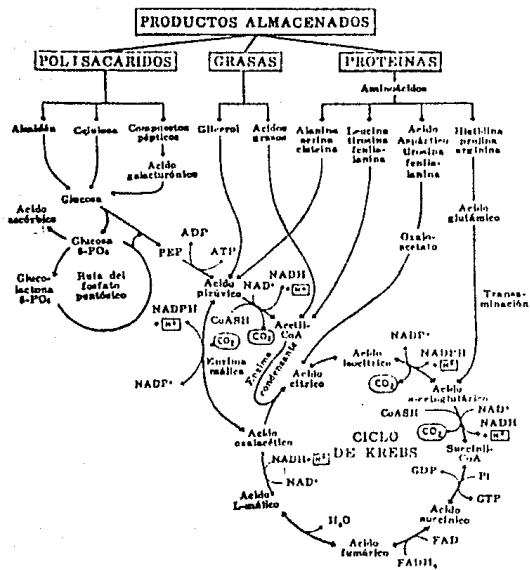
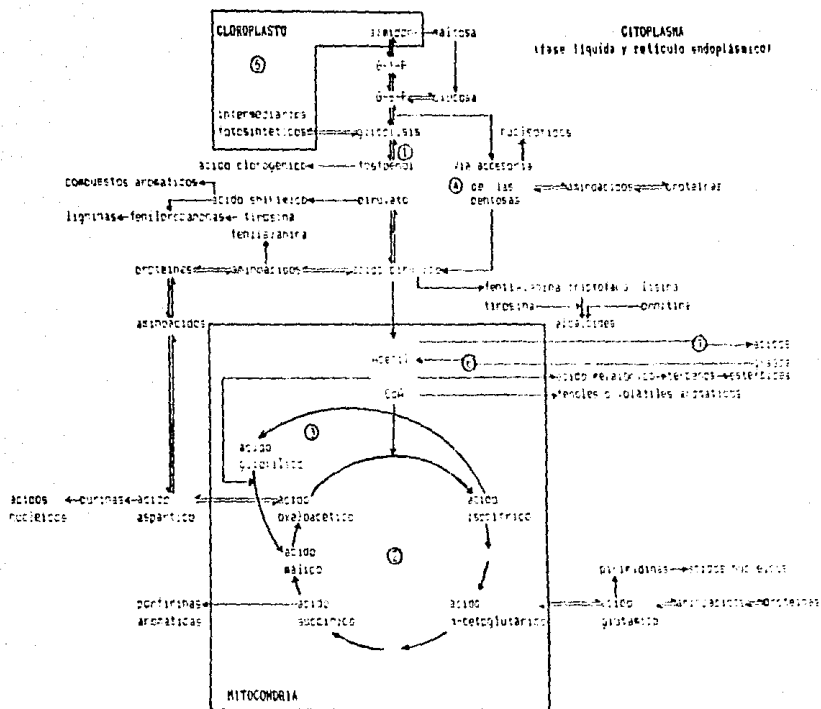


DIAGRAMA 7. RUTAS METABOLICAS DE LOS DIVERSOS SUSTRATOS RESPIRATORIOS.



AGTA: 1 Glucólisis; 2 Ciclo de Krebs; 3 Ciclo del glucoato; 4 Ciclo de las AMPs; 5 Ciclo de Calvin; 6 Ciclo de la β-oxidación de los ácidos grasos; 7 Ciclo del ácido graso sintético.

DIAGRAMA B. RELACIONES ENTRE LOS INTERMEDIARIOS DEL METABOLISMO ASIMILATORIO Y OTRAS SECCIONES METABÓLICAS.

FUENTE: Fisiología vegetal, A.S.S. Rowell AGT Ed. S.A. México; Fuentes de Bioquímica U.A.M. 157

activación por α -condensación con CoA de un ácido graso con $2n$ átomos de carbono. Posteriormente, el complejo ácido graso-CoA se oxida (dehidrogena) al homólogo insaturado correspondiente, con una doble ligadura entre los átomos de carbono ($n-1$) y ($n-2$).

El complejo ácido graso insaturado CoA se hidrata y oxida de tal forma que aparece una función cetónica en la posición ($n-3$) o β . Finalmente, el complejo se divide en acetil-CoA y un complejo con CoA semejante, correspondiente al ácido graso con $n-2$ átomos de carbono, para lo cual se requiere una molécula de CoA libre. La acetil-CoA se incorpora al ciclo de Krebs mientras que el complejo nuevamente se oxida, aportándose en dos átomos de carbono y así sucesivamente.

Los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono, que para vez se encuentran en la naturaleza, pero que surgen durante la degradación oxidativa de la valina e isoleucina (diagrama 10), pueden oxidarse también vía ciclo de oxidación del ácido graso, separándose sucesivamente restos de acetil-CoA hasta que llega a un resto terminal de 7 átomos de carbono, el propionil-CoA. Luego, este experimenta carboxilación mediante la propionil-carboxilasa, transformándolo en metilmalonil-CoA, a su vez la metilmalonil-mutasa lo isomeriza a succinil-CoA, el cual puede desacetilarse por la succinil-tioquinasa y producir succinato libre que puede incorporarse al ciclo de Krebs.

Ahora bien, se ha encontrado β -oxidación de ácidos grasos en una gran cantidad de células de semillas como las de la

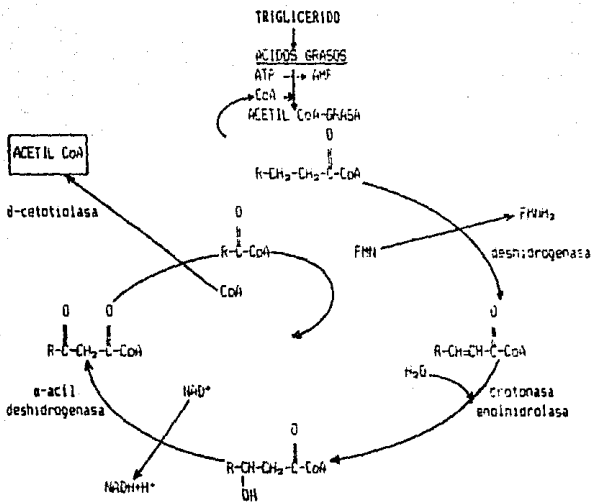
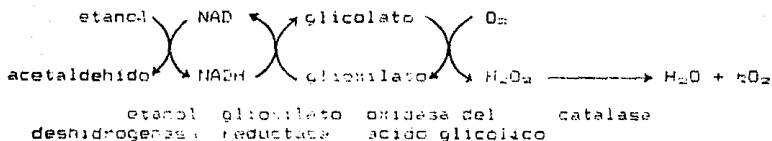


DIAGRAMA 9. CICLO DE LA OXIDACION DE LOS ACIDOS GRASOS (β-OXIDACION).
154

higuerilla, en cuerpos microscópicos, casi esféricos de aproximadamente 1μ de diámetro, limitados por una sola membrana, que parecen formarse a partir de vesículas derivadas del retículo endoplasmico, denominados glioxisomas. Estos contienen la maquinaria enzimática de la vía del glioxilato del metabolismo graso (ver diagrama 16), importante en la conversión de grasas a azúcares principalmente durante la germinación de semillas almacenadoras de grasas.

Por otra parte, consideradas como rutas secundarias de oxidación de ácidos grasos se encuentran la ω -oxidación, en donde algunos ácidos grasos experimentan la oxidación en el átomo ω formando ácidos α - ω dicarboxílicos y la oxoxidación (diagrama 18), llevada a cabo en el retículo endoplasmico, en la que el átomo de carbono α es oxidado a grupo aldehído a expensas del peróxido de hidrógeno. Dicha reacción es catalizada por la peroxidasa de ácido graso.

El H_2O_2 requerido es aportado por otras oxidaciones presumiblemente de las flavoproteínas reducidas o bien como producto de la oxidación del glicolato a glioxilato importante en la síntesis de glicina. Reacciones que pueden ligarse a la oxidación de ciertos sustratos, por ejemplo el etanol, en la forma siguiente:



El aldehído graso formado es oxidado al ácido carboxílico correspondiente.

Tal secuencia de reacciones efectuadas por dos enzimas se repite a continuación sobre el ácido graso acortado.

Puesto que las peroxidasa del ácido graso ataca únicamente a ácidos grasos de cadena larga que poseen entre 17 y 18 átomos de carbono, esta ruta no guía a la oxidación completa, por lo que se presume pueda actuar como fuente de alcoholes grasos de cadena larga que existen en grandes cantidades en el recubrimiento ceroso de los vegetales.

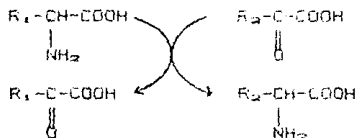
10.2 Vía oxidativa de las proteínas.

En primera instancia, las proteínas se descomponen a sus aminoácidos constitutivos.

La degradación oxidativa de los aminoácidos es más compleja que la oxidación de los ácidos grasos, ya que el proceso difiere para cada aminoácido, aunque al final todos se convierten en ácidos participantes del ciclo de Krebs: piruvato, acetil CoA, oxaloacetato, α -cetogluturato, succinil CoA y fumarato. En una u

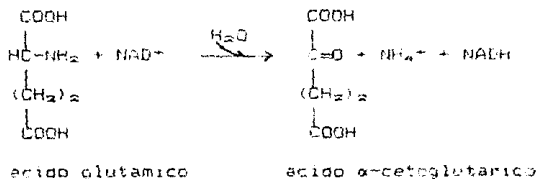
otra etapa, el proceso requiere de la eliminación del grupo amino, mediante la transaminación, en la mayoría de los casos.

La transaminación consiste en la transferencia de un grupo amino de un aminoácido a un α -cetoácido, tal como se indica a continuación:



Esta reacción es catalizada por transaminasas, enzimas que requieren de la coenzima fosfato de piridoxal (vitamina B₆).

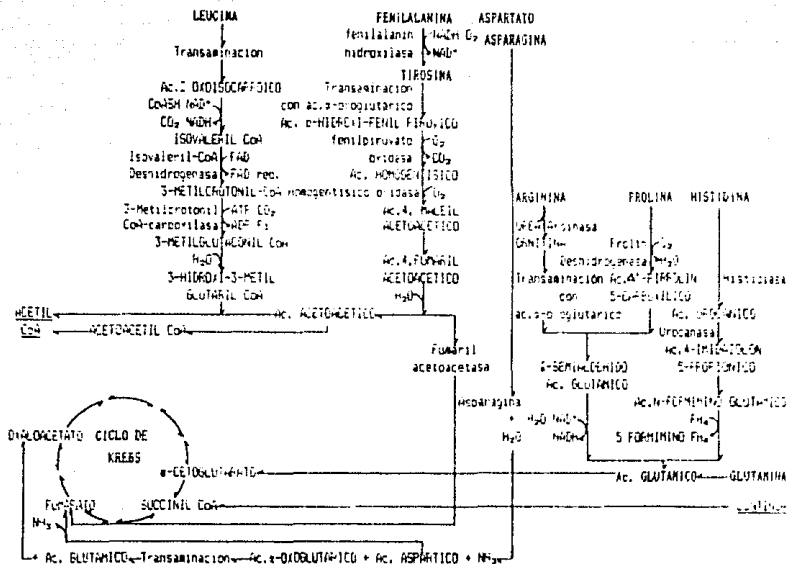
La mayor parte del nitrógeno de los grupos amino eliminados por transaminación se puede recuperar por ejemplo, como ácido glutámico, mismo que sufre desaminación oxidativa, catalizada por glutamato deshidrogenasa requiriendo NAD:



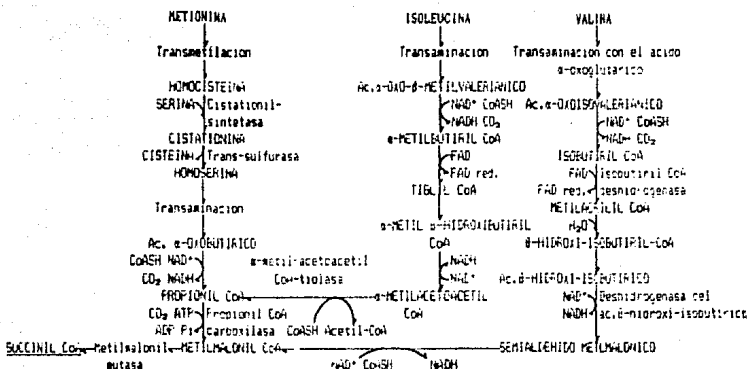
Así el ácido α -cetoglutarico formado se incorpora al ciclo de Krebs.

En el diagrama 10 se ilustra el proceso catabólico de los aminoácidos.

COMPLACIAS



Continuación



10.3 Vía oxidativa de carbohidratos.

En lo concerniente a los carbohidratos, son los sustratos más frecuentemente empleados en las oxidaciones biológicas y estos siguen las rutas, localizadas en la parte soluble de la célula:

1. Ruta de las pentosas fosfato o ciclo de las hexosas monofosfato (HMF).

2. Glucólisis o ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). El reverso es conocido como glucogénesis o gluconeogénesis. Es el proceso base de la respiración anaeróbica o fermentación.

Es característica de las células vegetales, la habilidad para oxidar los hexosas fosfato via glucólisis y la ruta fosfopentosa oxidativa. La actividad relativa de las rutas varía durante la diferenciación celular. En general, la actividad de la ruta de las pentosas fosfato es más alta cuando existe la necesidad más marcada de NADPH (ap. Rees, 1974, 1977). El NADPH es provisto para la biosíntesis y su disponibilidad es regulada independientemente de la glucólisis. (123)

La ruta HMF contribuye con menos o igual al 30 % del total de carbohidratos oxidados, por lo que en la glucólisis siempre predomina la oxidación de las hexosas fosfato. (123)

10.3.1 Ruta hexosamonofosfato (Ciclo de las pentosas).

Esta ruta reconocida por Horecker en 1953, llamada ciclo de las pentosas, conocida también como vía accesoria hexosamonofosfato (HMF) o vía del fosfogluconato, implica la secuencia de reacciones que en esencia convierten a la glucosa en triosa fosfato y CO_2 . Únicamente se produce una molécula de CO_2 por cada molécula de glucosa, o sea solo una molécula de hexosa de cada seis, entra en el ciclo transformándose en 6 CO_2 y 6 H_2O , mientras que las otras cinco moléculas entran nuevamente en el ciclo sufriendo una complicada reorganización. Dicha ruta de Horecker-Warburg-Dickens posee considerable similitud con las reacciones oscuras de la fotosíntesis, pero en sentido inverso. El ciclo HMF se muestra en el diagrama 11.

La enzima glucosa 5-fosfato deshidrogenasa, que contiene NADPH, es capaz de catalizar la oxidación de la D-glucopiranososa hasta 6-fosfogluconato. En un primer paso obteniendo fosfoglucono 5-lactona, para después ser hidrolizada espontáneamente a 6-fosfogluconato. En algunas fuentes se menciona la participación en esta reacción de la lactonasa. El β -cetocido producido, luego de una deshidrogenación subsiguiente, se descarboxila fácilmente.

La enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa, cataliza la descarboxilación oxidativa de este ácido para formar ribulosa 5-fosfato. La pentosa así obtenida mantiene un equilibrio con la ribosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato. Estas dos pentosas se

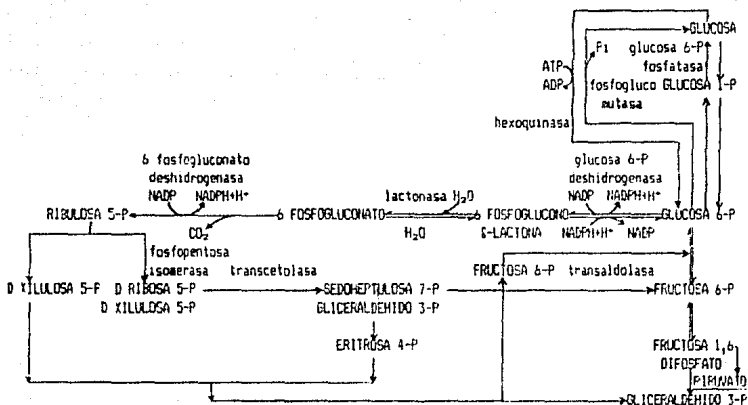


DIAGRAMA 11. RUTA HEXOSA MONOFOSFATO (HMF) O CICLO DE LAS PENTOSAS.

transforman mediante la enzima transcetolasa, en una triosa y un compuesto de siete átomos de carbono, que son respectivamente el gliceraldehído 3-fosfato y sedoheptulosa 7-fosfato. La porción de dihidroxiacetona de la sedoheptulosa se hidroliza fácilmente mediante la transaldolasa y se transfiere al gliceraldehído para formar una hexosa, en tanto el azúcar de cuatro carbonos restante, la eritrosa 4-fosfato se combina con una pentosa para formar fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato.

El balance de energía indica que por cada molécula de CO_2 producida a partir de glucosa se reducen dos moléculas de NADP formándose seis moléculas de ATP, o 36 ATP por cada molécula de glucosa oxidada.

Dado que se necesita un ATP para fosforilar la glucosa inicialmente, entonces la ganancia neta es de 35 ATP por glucosa, lo que la hace menos eficiente que la glucólisis y el ciclo de Krebs (38 ATP por glucosa). Ahora bien, pudiese recobrase más energía si el triosafosfato producido vía HMF entra al proceso glucolítico: se sintetizan 18 ATP en la producción de tres CO_2 , menos uno para la fosforilación inicial de la glucosa, se tiene para la siguiente oxidación del piruvato 15 ATP más, dando un total de 37 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada.

10.3.2 Ruta Embden-Meyerhof-Parnas (Glucólisis).

El término de glucólisis (rompimiento de azúcar) fue introducido por Lepine en 1909, el cual describe la fragmentación anaeróbica de la glucosa para producir dióxido de carbono y etanol.

Esta es la más importante ruta de oxidación de hexosas fosfato en células fotosintéticas donde domina la transformación de carbohidratos. Participan un grupo de once enzimas que catalizan la serie de reacciones secuenciales y debido a que en su extracción de las células se realiza en forma soluble, se considera que están localizadas en la parte soluble del citoplasma, con excepción de la hexoquinasa que se encuentra adherida a la membrana; se dice que entre ellos no existe dependencia física y pueden ser distinguidas en un complejo multienzimático.

No obstante, varios estudios han revelado que dicha ruta acontece en más de un compartimiento celular, además del citoplasma, en cloroplasto y en protoplastidos, solo en algunos tejidos (Murphy y Leech, 1977, 1978). La manera en que operan ambas rutas, la glucólisis y HMF en cloroplasto no es todavía entendida, pero sin lugar a dudas nunca operan en presencia de luz puesto que la glucosa 6-deshidrogenasa y fosfofructoquinasa son inactivas en tal condición. (143)

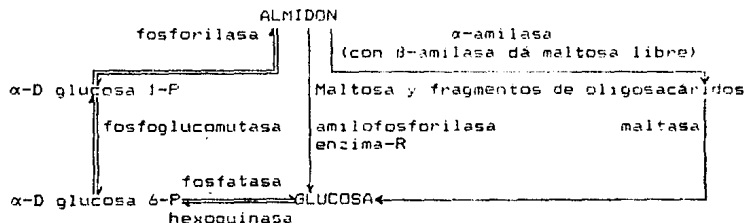
La glucólisis consta de dos etapas: la primera es un proceso

de reunión de hexosas que se fosforilan a expensas del ATP y son convertidas a un producto común, un carbohidrato de 3 átomos de carbono o triosa fosfato denominado, gliceraldehído 3-fosfato. En tanto la segunda la constituye la ruta común para todos los carbohidratos, son reacciones de conservación de energía (se requiere ATP y NADH), que están asociados con oxidación-reducción conduciendo a la formación de piruvato. La ruta es ilustrada en el diagrama 12.

a) Primera etapa.

La glucosa libre usualmente es considerada como el principio de la glucólisis. Puede ser transportada de manera directa a las células o bien, formada intracelular por degradación del almidón, sacarosa u otros carbohidratos complejos.

El almidón es degradado por reacción con la fosforilasa dando glucosa 1-fosfato:



La glucosa 1-fosfato puede convertirse mediante la enzima

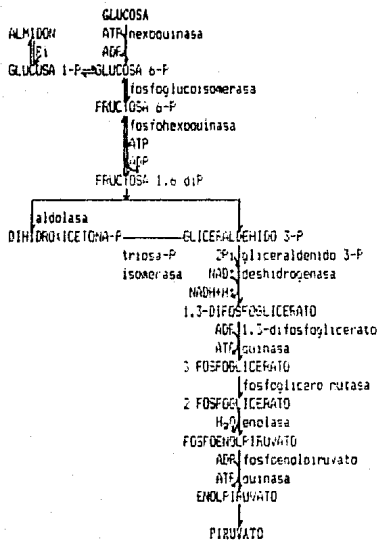
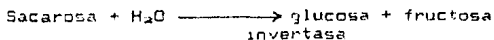


DIAGRAMA 12. RUTA ENERGÉTICA DE LA GLICOLISIS (GLICOLISIS).

fosfoglucomutasa y entrar a la ruta glucolítica. Pero la amilofosforilasa puede atacar solamente dos enlaces α -1:4-glicosido, y los enlaces 1:6 de la amilopectina deben ser rotos por la llamada enzima R (amilo-1,6-glucosidasa) dando moléculas de glucosa libre. También el almidón puede ser degradado por la α y β -amilasa, ambas rinden el disacárido maltosa. La maltosa es hidrolizada a glucosa por la maltasa. La α -amilasa ataca enlaces internos 1:4 en la molécula de almidón, rompiendo la cadena en fragmentos pequeños. La β -amilasa sólo ataca los ligamentos subterminales de la cadena liberando las dos hexosas terminales como maltosa. Desde luego, después del ataque de la α -amilasa quedan grupos restantes, si tienen enlaces 1:6 ramificados pueden quedar como restantes varias dextrinas límite, que sirven como iniciadoras en la síntesis del almidón.

Parece ser que la degradación por amilasa es propia de las semillas para movilizar sus reservas, en cambio por la fosforilasa, las hojas u otros órganos de la planta que almacenen almidón, como los tubérculos de papa.

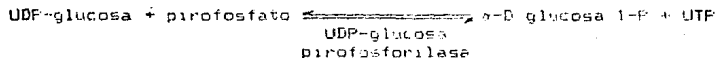
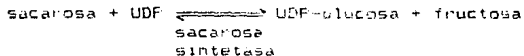
La sacarosa quizás entre al metabolismo respiratorio por medio de la enzima hidrolítica invertasa, que casi está totalmente distribuida en los tejidos vegetales.



La invertasa hidroliza a la sacarosa dando una mezcla equimolar de glucosa mas fructosa llamada, azúcares invertidos

(la sacarosa es dextrorrotatoria, pero la mezcla producida es levorrotatoria, así que al hidrolizarse la dirección de la rotación queda invertida).

Otro sistema para la degradación de la sacarosa incluye a las enzimas sacarosa sintetasa y UDP-glucosa pirofosforilasa en las reacciones:



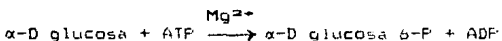
La UDP-glucosa es una coenzima que juega un papel importante en numerosas reacciones del metabolismo de los carbohidratos involucrados en la transformación de moléculas de azúcar, a través de la acción de las epimerasas.

La α -D glucosa 1-P de la misma manera como se explicó con el almidón, puede entrar a la secuencia glucolítica.

En cuanto a los carbohidratos complejos que pueden degradarse hasta glucosa libre se encuentran: la celulosa, principal elemento estructural de la pared celular; las hemicelulosas, polisacáridos complejos que acompañan a la celulosa en la pared celular, así como pectinas y gomas vegetales. Los cuales pueden ser hidrolizados a cadenas más cortas de oligosacáridos, finalmente a celobiosa y glucosa.

Luego entonces, la molécula neutra de la D-glucosa formada,

se moviliza fosforilándose a costa del ATP en la posición 6, formando glucosa 6-fosfato. Al cargarse la molecula negativa queda lista para las reacciones futuras.



La reaccion es catalizada por dos tipos de enzimas que varían en su afinidad por la D-glucosa: la hexoquinasa y la glucoquinasa. Está limitada la informacion al respecto y aun no resulta ser muy claro su papel, pero se sabe que la hexoquinasa es la enzima más importante y es empleada normalmente por la mayoría de las células vegetales. Puede además convertir la D-manosa y D-fructosa a sus carbohidratos 6-fosfato, por lo que se presume sea el primer paso en el metabolismo de esos azúcares. Entre otras características, posee mayor afinidad por las aldohexosas que por las cetohechosas, requiere la presencia de un catión divalente (Mg^{2+}) como cofactor y como ya se había mencionado se halla adherida a la membrana.

La reacción tiene una energía libre estándar de Gibbs a 60° de -3.4 Kcal/mol, al ser este valor pequeño indica que la reacción es fuertemente exergónica e irreversible.

Las proporciones de hexosas en los tejidos de los productos hortofrutícolas varían de acuerdo al estado de desarrollo o bien por condiciones de anaerobiosis.

En tejidos de zanahoria almacenados en fresco en N_2 , se reportaron ligeros efectos en el contenido de dicha hexosa

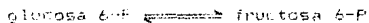
6-fosfato y fosfoenolpiruvato (PEP), pero se observa que en tejidos envejecidos disminuyen dichos sustratos (Barker et. al, 1967; Faiz-un-Rehman et. al, 1974).

Barker y Khan (1968) detectan que algunas veces en manzana y en papa en condiciones de anoxia o ausencia de oxígeno, ocurre una disminución en PEP y de la hexosa 6-fosfato.

Según Solomons y Laties (1974), la estimulación de la glucólisis en aguacate fue acompañada por un incremento en glucosa 6-fosfato. Los mismos autores un año más tarde probando con papas observan el efecto contrario es decir, una disminución de la glucosa 6-fosfato, lo cual podría deberse quizás a que no utilizaron similares condiciones experimentales.

En lo concerniente a la glucoquinasa se tiene conocimiento que necesita un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) de la misma manera que la hexoquinasa, pero su afinidad es mucho menor, además de ser inhibida por arsenicales.

Posteriormente la glucosa 6-fosfato formada es convertida a fructosa 6-fosfato.

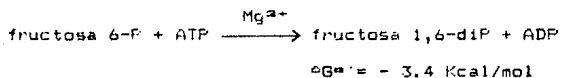


$$\Delta G = + 0.5 \text{ Kcal/mol}$$

La isomerización es catalizada por la fosfoglucoisomerasa, requiriendo iones Mg^{2+} o Mn^{2+} . La reacción fácilmente puede efectuarse en ambas direcciones.

La fructosa 6-fosfato se fosforila formando fructosa 1,6-di-

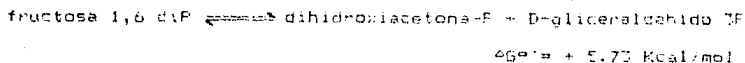
fosfato por acción de la fosfofructoquinasa. Esta reacción es importante en la regulación de la secuencia glucolítica, en donde la actividad de la enzima es responsable de los cambios de concentración de los metabolitos; asume varios estados de agregación y fácilmente sufre cambios de equilibrio, los cuales están en función del pH y presencia de sustrato, entre otros no menos importantes.



Existe la certeza que en las hojas se hallan isoenzimas de fosfofructoquinasa y una de ellas se localiza en cloroplasto, lo que significa que puede formarse el 3-fosfoglicerato (Kelly y Latzko, 1977). Más reciente, Murphy y Leech (1977, 1978) indican que los cloroplastos pueden convertir el 3-fosfoglicerato a piruvato vía glucólisis, esto resulta cuestionable puesto que en otros estudios (Slitt y ap. Hess, 1979) se señala la ausencia de la fosfogliceromutasa en el cloroplasto de chicharo y esos datos podrían ser erróneos debido posiblemente a una contaminación del cloroplasto por el citoplasma durante la extracción de la enzima.

Hasta éste momento, el esqueleto carbonado de la hexosa permanece intacto y a partir de aquí ocurre la fisión de la hexosa difosforilada para dar dos fosfotriosas: el gliceraldehído 3-fosfato y fosfato de dihidroxiacetona. La reacción, que en

esencia es la inversa de una condensación aldólica, es catalizada por la enzima aldolasa que requiere Zn^{2+} , Ca^{2+} o Fe^{2+} y K^+ .

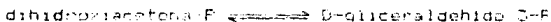


Al observar el ΔG° altamente positivo, puede parecer improbable que la reacción se de hacia la izquierda, pero al ser la concentración de la fructosa 1,6 difosfato en célula intacta muy baja ($\approx 0.1 \text{ mM}$) comparada con la estándar (1.0 M), en el cálculo de la energía libre:

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K^{\circ} = - RT \ln \frac{[\text{triosa-P}]^2}{[\text{fructosa 1,6 dP}]}$$

La constante de equilibrio (K) se ve influenciada por la concentración del reactante, por lo que a bajas concentraciones de la célula en condiciones normales la reacción resulta reversible, expresado de otro modo, a menor concentración de fructosa 1,6 difosfato mayor será la fracción desdoblada antes de que se alcance el estado de equilibrio.

Las dos triosas son interconvertibles.



$$\Delta G^{\circ} = 1.63 \text{ Kcal/mol}$$

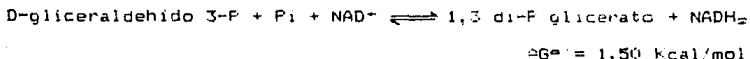
La reacción es catalizada por la triosa fosfato isomerasa y solo el gliceraldehido 3-fosfato puede ser directamente degradado en las siguientes reacciones.

La dihidroxiacetona-fosfato se transforma reversiblemente en

gliceraldehído 3-fosfato.

b) Segunda etapa.

Esta etapa, donde se regenera ATP y NADH, principia con la transformación del D-gliceraldehído 3-fosfato a 1,3 difosfoglicerato.



Cada molécula de glucosa forma dos de gliceraldehído 3-fosfato. Es una etapa importante porque conserva la energía de oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato en forma de un fosfato de elevado nivel energético, el 1,3 difosfoglicerato.

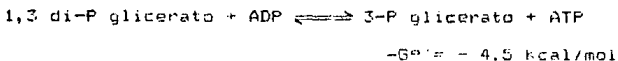
Normalmente la oxidación de aldehído a ácido a un pH neutro es favorecida termodinámicamente sin embargo, la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato es acoplada a una reacción de fosforilación y parte de la energía de oxidación es disponible para la formación de un fosfato ácido, y además al incluir todo el cambio de energía pequeño, la reacción se torna reversible.

El producto 1,3 difosfoglicerato tiene un alto potencial de transferencia de fosfato (ΔG° hidrólisis = - 11.8 Kcal/mol). Comparado con el ATP que es igual a - 7.3 Kcal/mol, es mejor

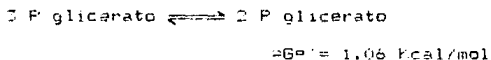
donador de fosfato que el ATP mismo.

En dicha reacción interviene la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa que requiere NAD^+ .

En la reacción siguiente, la unión fosfato de alta energía del 1,3 difosfoglicerato se transfiere al ADP para regenerar una molécula de ATP y dar 3-fosfoglicerato, obteniendo fosforilación a nivel sustrato. La reacción es catalizada por la fosfogliceratoquinasa.

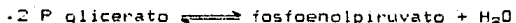


Después el 3 fosfoglicerato se isomeriza a 2 fosfoglicerato por la acción de la enzima fosfogliceromutasa, siendo esencial el ión Mg^{+2} .



Al ser pequeña la variación de la energía libre estándar, es reversible la reacción.

Luego, al perder una molécula de agua el 2 fosfoglicerato, se convierte en fosfoenolpiruvato. Esta constituye la segunda reacción para la producción de un enlace fosfato de alta energía catalizada por la enolasa que requiere de Mg^{+2} o Mn^{+2} para formar un complejo, antes de unirse al sustrato. La enzima se inhibe por el ión fluoruro.



$$\Delta G^\circ = 0.44 \text{ kcal/mol}$$

A pesar de que el cambio de energía libre normal global de la reacción es muy pequeño, la unión éster fosfato se transforma en una unión fosfato de alta energía.

El fosfoenolpiruvato pierde ahora su ácido fosfórico con el ADP en una reacción fuertemente exergónica catalizada por la fosfoenol piruvato quinasa. Esta enzima regula el flujo dentro y fuera de la glucólisis (en la ruta HMF), es inhibida por ATP y citrato a concentraciones milimolares (Stumpf y Conn, 1980) y necesita de los iones divalentes Mg^{+2} o Mn^{+2} para formar un complejo antes de unirse al sustrato. El ión Ca^{+2} compite con éstos iones formando un complejo inactivo. Además ésta enzima requiere de un catión metálico alcalino monovalente entre los que se encuentran K^+ , Rb^+ y Cs^+ . El K^+ es el activador fisiológico y se asume que la unión del K^+ genera un cambio en la conformación de la enzima haciéndola más activa (Lehninger, Besford, 1975).

En ausencia de ADP una enzima hidroliza al fosfoenol piruvato (Besford, 1975), la cual ha sido atribuida a la fosfatasa (Stumpf y Conn, 1980), ésta es estimulada por iones magnesio (en concentraciones por arriba de 30 mM MgSO_4) y es inhibida por cationes monovalentes como el K^+ , demostrada en hojas de tomate y pepino. al detectar enzimas específicas como indicadores bioquímicos en el diagnóstico de imbalances

nutricionales en vegetales (Besford, 1975).

También el piruvato juega un papel central en el metabolismo de los aminoácidos como precursor directo de la alanina, isoleucina y valina. Durante el catabolismo de proteínas es un producto de la degradación de alanina, cisteína, glicina y serina entre otros; puede formarse por la descarboxilación del malato mediante la enzima malica, localizada en la parte soluble de la célula.



$$\Delta G_{\text{neto}} = -7.50 \text{ kcal/mol}$$

Así, el balance de energía de la glucólisis contempla el consumo de 2 ATP de la conversión inicial de glucosa a fructosa 6-fosfato (- 2 ATP), y la generación subsiguiente debido a la fosforilación a nivel sustrato de 2 ATP en la conversión de 2 moléculas de fosfoenolpiruvato a piruvato (+ 4 ATP). Por lo tanto, el balance neto es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que se convierte en piruvato. Adicionalmente, durante la oxidación de dos moléculas de gliceraldehído 1,3 difosfato a 1,3 difosfoglicerato, dos moléculas de NAD son reducidas a NADH. Como la reoxidación de cada molécula de NADH por el oxígeno a través del sistema de transporte electrónico genera tres moléculas de ATP, en total son seis moléculas de ATP más por molécula de glucosa. Así pues, la producción total neta de glucólisis en términos de intermediarios de alta energía por

mol de glucosa catalizada es de 2 moles de ATP + 2 moles de NADH u ocho moles de ATP, lo que representa aproximadamente 58.4 kcal/mol de glucosa (8 por 7.3) o sea cerca del 8 % de la energía total utilizable de la glucosa (el valor calorico de la glucosa es de 720 kcal/mol de glucosa). Algo de energía se pierde como calor durante la conversión de la glucosa a piruvato, sin embargo, una proporción mayor queda contenida en las moléculas de piruvato para ser liberada en las reacciones oxidativas del ciclo de Krebs.

Entonces, dado que la última etapa de la secuencia glucolítica es común tanto al proceso aeróbico como al anaeróbico, el destino del piruvato dependerá del tipo de catabolismo. En el caso de la respiración se oxida y descarboxila a acetato poco antes de entrar al ciclo de Krebs. En los procesos fermentativos se reduce a acetaldehído o a etanol.

Fermentación.

En ausencia de oxígeno no pueden llevarse a cabo las reacciones oxidativas del ciclo de Krebs y los organismos tienen que depender exclusivamente de la energía liberada en la glucólisis. Pero se presenta otro problema, el NADH formado durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato via glucólisis, no puede reoxidarse por la limitación de oxígeno. Por lo tanto,

se necesita de otro sistema que pueda permitir la regeneración rápida del NAD⁺ requerido para provocar la continuación del flujo glucolítico.

La solución al problema se da de dos maneras:

Una por la reducción del piruvato a lactato catalizada por la lactato deshidrogenasa y la otra, la descarboxilación del piruvato a acetaldehído catalizada por la piruvato carboxilasa y como segundo producto, etanol a partir del acetaldehído, participando la enzima alcohol deshidrogenasa, con la reoxidación del NADH. Estas reacciones se representan en el diagrama 13.

Como resultado de la necesidad de reoxidar el NADH, la producción de energía mediante la conversión de una molécula de glucosa a 2 moléculas de lactato o etanol es muy pequeña, solamente se producen 2 moléculas de ATP (cerca de 15.6 Kcal/mol) lo cual representa el 2.2 % de la energía total, siendo extremadamente baja la recuperación de energía por esta vía comparada con las otras.

El lactato puede formarse conjuntamente con el etanol, sin embargo este no es el principal metabolito porque casi no se ha detectado en tejidos vegetales, solo en algunos casos como en papa. En pocos vegetales se encuentra etanol con CO₂ como productos de fermentación.

Dentro de los principales productos en anaerobiosis en función de la resistencia del producto, se ha encontrado acumulación de alanina

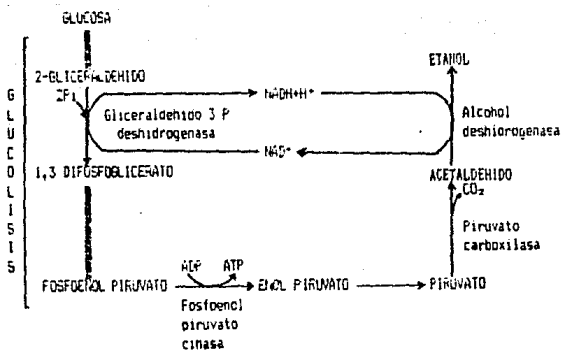


DIAGRAMA 13. VIA DE FERMENTACION.

y β -aminobutirato (Effer y Fanson, 1967). No obstante, Crawford (1969) demuestra que a altos niveles de etanol no existe acumulación de ácidos orgánicos. Puede entonces suponerse que la acumulación de ciertos ácidos está asociada con el período en el que transcurre la anaerobiosis puesto que, Davies (1973) demuestra que el comienzo de la anaerobiosis está acompañada por una inmediata acumulación de ácidos tales como malato o lactato, lo cual causa un descenso en el pH, que repercute con los cambios enzimáticos dando lugar a un círculo vicioso, porque esto mismo limita la producción de algunos otros ácidos.

Este mismo efecto está relacionado con el daño por frío en los productos hortofrutícolas.

Clijsters (1965) propone que la producción de acetaldehído y etanol es una de las posibles causas del oscurecimiento en manzanas "Jonathan". Datos similares son reportados por Murata y Ito (1965) en el caso de plátanos. Murata posteriormente (1969) demuestra que el contenido de dichos productos de fermentación en cascara y pulpa de plátanos se incrementa con el avance del daño por frío.

La acumulación de los ácidos del ciclo de Krebs en los tejidos de vegetales sujetos a baja temperatura, puede explicarse en parte a que ciertas concentraciones de acetaldehído inhiben la actividad de la piruvato deshidrogenasa interfiriendo en las trayectorias metabólicas normales (Murata y Ito, 1966).

Por otra parte, cuando la deficiencia de oxígeno da lugar al

proceso de fermentación ocurre una disminución en la síntesis celular. Esto ordinariamente es conocido como el efecto Pasteur y está relacionado con un déficit en: ATP, 2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato y con un incremento en: ADP, fructosa 1,6 difosfato y fosfato inorgánico. Actualmente tal efecto puede ser explicado en términos del control metabólico ejercido por la actividad de la fosfofructoquinasa, ya que es regulada por el ATP.

10.3.2.1 Control de la glucólisis.

Debido a que la respiración es un proceso exotérmico es decir, libera energía, debe ejercerse algún control, ya que de lo contrario procedería acelerada y continuamente hasta que todo el abastecimiento de sustrato se agotara.

No es sencillo establecer como se efectúa el control, dado que el principal problema es la carencia de datos confiables, en particular sobre las determinaciones de sustrato que varían poco con respecto al flujo, sin embargo, quizás esto no tenga un serio efecto para reconocer las reacciones no equilibradas, por lo que puede decidirse cuales son regulatorias basándose en que las diferencias entre las constantes de equilibrio aparentes y la proporción acción-masa de reacciones no equilibradas resultan ser grandes o bien, atendiendo a los cambios de energía libre. Si son bastante exotérmicas, resultan irreversibles y por lo regular

están asociadas con un fuerte cambio negativo en la energía libre.

Fues bien, dentro de las enzimas reguladoras de la glucólisis destacan:

1. La hexoquinasa como modulador negativo en la biosíntesis de la glucosa. Sin embargo, en su estudio Turner et. al (1977) prueban en chicharos que la hexoquinasa no fué inhibida por bajas concentraciones de α -D glucosa 6 fosfato.

2. La fosfofructoquinasa que fosforila a la fructosa 6 fosfato convirtiéndola a fructosa 1,6 difosfato utilizando ATP como su donador. Esta enzima es afectada por una gran variedad de reguladores potenciales (Turner y Turner, 1975) entre ellos:

a) Es inhibida por ATP (trifosfato de adenosina) pero no por AMP (5-monofosfato de adenosina), contrariamente a lo que sucede en animales; y estimulada por ADP (difosfato de adenosina) y P_i (fosfato inorgánico) además del ortofosfato.

b) Es inhibida por la concentración de algunos intermediarios glucolíticos como el 3 fosfoglicerato, 2 fosfoglicerato y fosfoenpiruvato. Este último es el más significativo, es activo a concentraciones de $1.7 \mu M$ causando el 50 % de inhibición.

c) El 6 fosfogluconato y el citrato producido por el ciclo de Krebs también la inhiben.

De manera que puede deducirse su compleja dependencia en la velocidad de reacción.

3. La fosfoenolpiruvato quinasa que participa en el paso de fosfoenolpiruvato a piruvato es inhibida por ATP y citrato (procedente del ciclo de Krebs) a concentraciones milimolares (Turner y Turner, 1975; Stumpf y Conn, 1980).

El papel regulador de la fosfofructoquinasa y piruvato quinasa queda establecido en el trabajo de Ruffner y Hawker (1977), donde muestran que disminuye la glucólisis durante la maduración de uvas acompañada del incremento de la fructosa 6-fosfato y fosfoenolpiruvato.

Similares resultados obtienen Lebate y Leegood (1989) al determinar la influencia de la baja temperatura en la respiración y en los contenidos de intermediarios fosforilados en cebada, el fosfoenolpiruvato mantiene un elevado nivel tanto a 5 como a 30 °C. De la misma manera se encuentra en los frutos u hortalizas expuestos a las temperaturas en las que se suscitan los daños por frío. Los pimientos (cultivo Sakigake midori) almacenados a 1.1 y a 6.1 °C acumulan piruvato (Ogata et. al, 1968). Igual efecto es confirmado después (1969) por los mismos investigadores en plátanos var. Sin-zun, los cuales son muy sensibles al daño por frío, los estudiaron durante y después de la exposición a 4 y 6 °C por 4, 9 y 15 días. Así, al acumularse el piruvato, el fosfoenolpiruvato puede derivarse hacia la formación de ácido clorogénico (ver diagrama B), un fenilpropanoide causante del color pardo en semillas de pimiento como también el puede dar lugar al incremento del ácido shilímico, precursor de compuestos

aromáticos (Kozuke y Ogata, 1971).

4. Las enzimas piruvato descarboxilasa que intervienen en la reacción de piruvato a acetil CoA están relacionadas con la regulación. Con la presencia de ADP, Ca^{++} y piruvato descarboxilasa fosfatasa se incrementa la actividad, mientras que con ATP y la piruvato descarboxilasa cinasa se inactiva la reacción.

5. Las enzimas piruvato carboxilasa y alcohol deshidrogenasa como es obvio son inhibidas por la presencia de oxígeno y también por la gran cantidad de ADP y P_i tal como lo demuestra Broxers H. (1961) en experimentos con dinitrofenol (DNF) un desacoplante de la fosforilación oxidativa. Este compuesto puede causar un cambio notable de la respiración hacia la fermentación, aun en presencia de oxígeno.

La piruvato carboxilasa es activada a veces por la acetil CoA, un compuesto que se llega acumular si es retardado el ciclo de Krebs por la presencia de intermediarios que requieren reemplazo.

10.4 Ciclo de Krebs (Ciclo de los ácidos tricarbóxicos).

El ciclo de Krebs es la ruta común final en condiciones aerobias del catabolismo oxidativo en donde convergen todas las moléculas combustibles. Fue propuesta por H.A. Krebs en 1937 y elucidada en plantas por Davies y Ellis en 1964.

Durante este ciclo los grupos acetilo se desintegran para formar dos moléculas de CO_2 (compuesto importante para el control y síntesis de una gran variedad de moléculas que participan en las diversas vías metabólicas) y 4 pares de átomos de hidrógeno que posteriormente se incorporan al sistema de transporte de electrones para la producción de ATP y reducción del oxígeno molecular. Por lo tanto, el ciclo de Krebs tiene la característica primordial de ser una ruta anfibólica es decir, que no tan solo tiene funciones catabólicas sino también provee precursores para rutas anabólicas, por ejemplo el α -cetoglutarato llega a ser aminado para suministrar glutamato. Además existen mecanismos especiales mediante los cuales los intermediarios pueden ser abastecidos para permitir que la respiración continúe, esas son las llamadas reacciones anapleróticas como por ejemplo, cuando el ciclo de Krebs está deficiente en oxalacetato, el fosfoenolpiruvato puede ser carboxilado a oxalacetato.

El paso inicial involucra la formación del acetil CoA a partir del piruvato, producto final de la glucólisis, en una reacción compleja irreversible en la que participan 3 enzimas combinadas, lo cual se conoce como el complejo piruvato deshidrogenasa y 5 cofactores: pirofosfato de tiamina (TPP), iones Mg, NAD^+ , coenzima A (CoA) y ácido lipoico. Esta reacción une a la glucólisis con el ciclo de Krebs.

El primer paso de dicha reacción, consiste en la formación de un complejo entre el TPP y el piruvato, seguido por la

descarboxilación de este último, requiriendo Mg^{++} y piruvato descarboxilasa.

En un segundo paso, el grupo acetilo es transferido de el derivado TPP (o hidroximetil pirofosfato de tiamina) al ácido lipoico. En la reacción el ácido lipoico es reducido y el acetaldehído pasa por oxidación a ácido. El ácido recién formado origina un tioéster con el ácido lipoico.

En el tercer paso, el grupo acetilo es transferido a la coenzima A, siendo los productos de la reacción acetil coenzima A y ácido lipoico reducido o dihidrolipoato. la enzima que actúa es la lipoato acetil transferasa.

Durante el paso final se regenera el ácido lipoico (forma oxidada), con una enzima la cual contiene estrechamente unida FAD denominada dihidrolipoato deshidrogenasa, y los átomos de hidrógeno son transferidos al NAD^{+} . Esta reacción es importante porque aporta el suministro continuo de ácido lipoico necesario para la formación de acetil coenzima A a partir de piruvato. También, los 2 electrones transportados al NAD^{+} para formar $NADH_2$ terminan pasando por el sistema transportador de electrones (que se verá más adelante) con la consecuente formación de 3 moléculas de ATP.

En el diagrama 14 se presenta en forma resumida las reacciones citadas.

Cabe señalar que el complejo piruvato deshidrogenasa se inhibe con arsenicales trivalentes o con el arsenito que puede

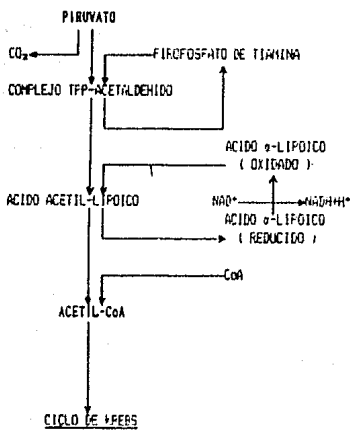


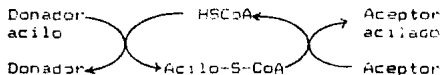
DIAGRAMA 14. CONVERSION DE PIRUVATO A ACETIL CoA.
186

reaccionar con ambos grupos tiol, formando un derivado ciclico inactivo. En investigaciones recientes se ha demostrado que tal complejo puede ser inhibido por ATP a ciertas concentraciones.

El piruvato es el sustrato comun en las rutas EMF o gluconeogenesis, ciclo de los acidos tricarbolicos e interviene en la fotosintesis.

El pirofosfato de tiamina (TPF), antes denominado cocarboxilasa, es la coenzima de cierto numero de enzimas que catalizan las descarboxilaciones oxidativas o no oxidativas de α -cetoacidos como el piruvato. Actua transfiriendo grupos aldehidos activos. La transcetolasa contiene a la TPF como coenzima, la cual forma parte en la ruta HMF, realizando la transferencia de un grupo glicolaldehido desde el D-xilulosa-5-fosfato al D-ribonosa-5-fosfato. El TPF es el ester pirofosforico de la tiamina o mejor conocida como vitamina B₁.

La coenzima A o D(-fosfo-ADP-pantoil-B-alanil)cisteamina involucra la transferencia de grupos acilo. La forma acetilada de la CoA designada como acetil coenzima A, acetil-CoA o acetil-S-CoA, tiene la función de portador de un acilo de acuerdo al esquema general:

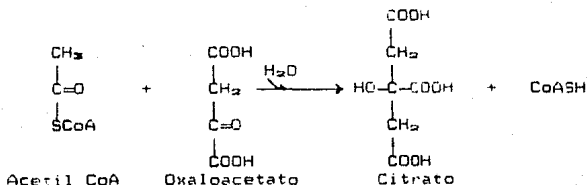


Además, participa en un amplio rango de reacciones de

procesos bioquímicos importantes incluyendo la oxidación del piruvato por el ciclo de Krebs; en la oxidación de ácidos grasos; la síntesis de ácidos grasos; en la síntesis de nucleótidos; como precursor de compuestos fenólicos o aromas volátiles y del malonato, inhibidor de la succinato deshidrogenasa así como en la oxidación de la fenilalanina.

A partir de este momento se citan las reacciones que se verifican en el ciclo de Krebs, proceso llevado a cabo en la matriz mitocondrial e ilustrado en el diagrama 15.

La primera de la serie de reacciones es la condensación del acetil-CoA con oxaloacetato (el grupo metilo del acetil CoA se condensa con el átomo carbonílico del oxaloacetato) con la consecuente hidrólisis del enlace triéster, dejando libre al CoA-SH y formando citrato. dicho de otra manera, el grupo acetilo del acetil CoA es transferido al oxaloacetato. Esta reacción es catalizada por la enzima citrato sintetasa (enzima de condensación) dando como resultado la conversión de un ácido dicarboxílico de 4 carbonos a un ácido tricarboxílico de 6.



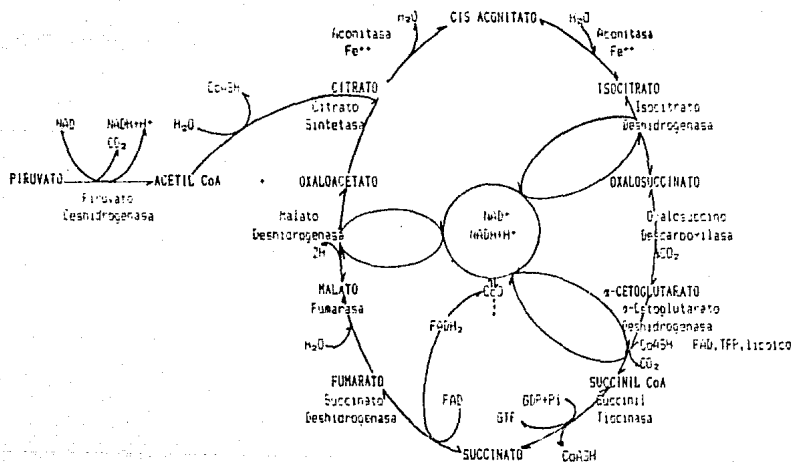
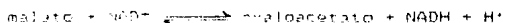


DIAGRAMA 15. CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS (TCA). CICLO DEL ACIDO CITRICO O CICLO DE PEPES.
189

El oxaloacetato puede ser regenerado a partir del citrato en una serie de reacciones en las que se producen 2 moléculas de CO_2 y 8 átomos de hidrógeno. Participa en el ciclo del glioxilato (ver punto 10.1 y diagrama 16), en fotosíntesis, en la oxidación de aminoácidos como el aspartato y asparagina (ver diagrama 10) y en la gluconeogénesis, en la cual se obtiene oxaloacetato extramitocondrial a partir de malato que se difunde al citoplasma circundante a la mitocondria, donde se reoxida gracias a la enzima malica ligada al NAD.



Posteriormente con la acción de la fosfoenol piruvato carboxiquinasa en el citoplasma, puede ser convertido a fosfoenolpiruvato, en donde el donador de fosfato es el GTP o el IIF.



Es difícil fijar hasta que punto el oxaloacetato es considerado en la provisión del ciclo de Krebs, durante la biosíntesis, en la producción de contra-iones y en la regulación del pH.

Se asume que las interconversiones reversibles de deshidratación-hidratación de los 3 primeros ácidos del ciclo (citrato, cis aconitato e isocitrato) son catalizados por la misma enzima, la aconitasa, la cual requiere Fe^{2+} como cofactor para activarla y estabilizarla.

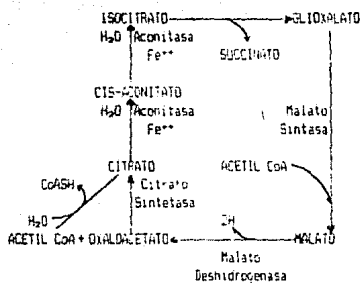
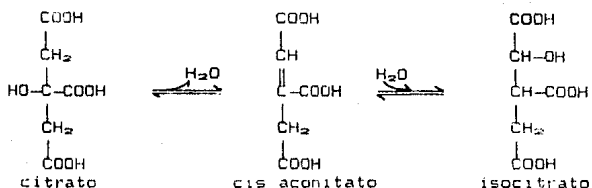
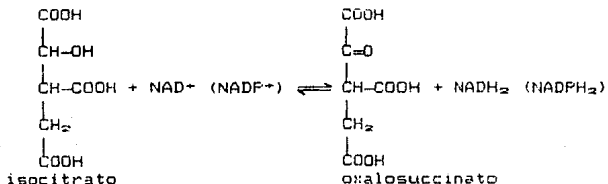


DIAGRAMA 16. CICLO DEL GLIOXALATO.



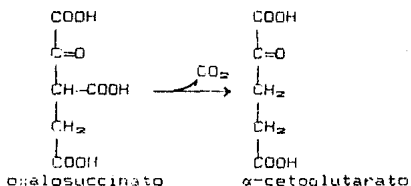
En presencia de la isocitrato deshidrogenasa, el isocitrato se convierte a oxalosuccinato. Es el primer paso oxidativo del ciclo de Krebs, en donde se desprenden del isocitrato 2 electrones y 2 iones hidrógeno que son tomados por el NADP^+ para formar NADPH^+ . Se sabe que los vegetales contienen dos tipos de la enzima, una que depende del NAD^+ como aceptor de electrones y otra del NADP^+ , ambas reacciones son idénticas y requieren de Mg^{+2} .



La enzima que requiere NAD^+ es la que se halla exclusivamente en las mitocondrias.

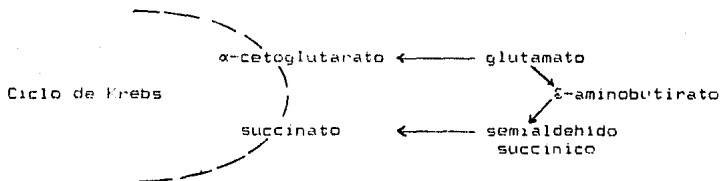
La próxima reacción comprende la descarboxilación del oxalosuccinato para formar α -cetoglutarato, con la intervención

de la carboxilasa.



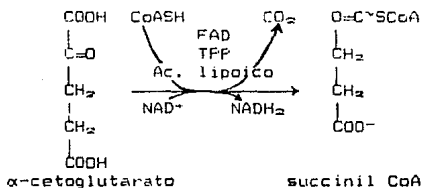
El α -cetoglutaratato es un compuesto clave en el metabolismo del vegetal, no solo interviene en la oxidación de carbohidratos y lípidos, sino también juega un papel importante en la síntesis y degradación de aminoácidos como arginina, histidina, glutamina, y prolina, que a su vez son transferidos a glutamato.

Se ha propuesto una ruta para el glutamato via δ -aminobutirato en relación con el ciclo de Krebs en estudios de tejidos de tomate, en donde se observa que el glutamato es convertido a ácido δ -aminobutírico y éste se incorpora a otros ácidos en el ciclo, pero a medida que maduran los frutos, la tasa de conversión y de incorporación disminuyen (Yamanaka et. al, 1972).



La segunda reacción deshidrogenasa descarboxilasa es la correspondiente a la oxidación del α -cetoglutarato que parece ser análoga a la del ácido pirúvico, el complejo de enzimas se llama colectivamente deshidrogenasa α -cetoglutarica e involucra la presencia de TFP, y el semialdenido succínico formado produce un complejo con el ácido lipóico oxidado así que, el componente succinilo de dicho complejo es transferido a la coenzima A, formando succinil CoA y ácido lipóico reducido que luego es reoxidado por una enzima que contiene NAD^+ .

Es el segundo paso oxidativo del ciclo en una reacción irreversible:



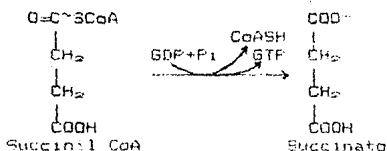
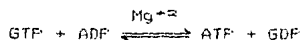
El succinil Coa interviene en la oxidación de ácidos grasos y de los aminoácidos tales como, isoleucina, metionina y valina, también en la síntesis de metionina, importante precursor del etileno y participa en la síntesis de clorofila a partir de α -aminolevulinato.

La succinil CoA es un tioéster de elevado contenido energético de uno de los grupos carboxilo del ácido succínico, esta energía puede ser liberada en la reacción siguiente en la

que pierde su grupo CoA, en presencia de difosfato de guanosina (GDP) y de fosfato inorgánico en el que se conserva la energía para formar trifosfato de guanosina (GTP) y succinato.

La enzima que cataliza la reacción es la succinil-tiocinasa o succinil-CoA-sintetasa.

El GTP formado no es inhibido por el Dinitrofenol (DNF). Esta reacción es una fosforilación a nivel sustrato es decir, puede generarse ATP por la acción de difosfato nucleosido quinasa.

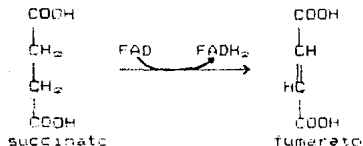


El succinato está presente en el ciclo del glioxilato, en la gluconeogénesis y como compuesto que da origen a aminoácidos controla el proceso de maduración de los productos vegetales.

La oxidación del succinato para dar lugar a fumarato, es relevante puesto que es la única reacción del ciclo que no emplea nucleótido de piridina, en su lugar el succinato se deshidrogena (se oxida) por la deshidrogenasa succínica, una ferriproteína

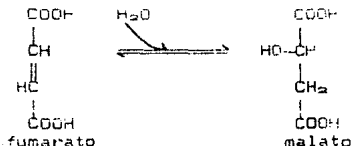
(es la única enzima que se localiza en la membrana interna mitocondrial) transfiriendo 2 iones hidrogeno y 2 electrones para reducir el grupo prostetico de la flavina, el flavin-adeninodinucleotido (FAD).

Esta reaccion corresponde a la tercera oxidacion del ciclo de Krebs.

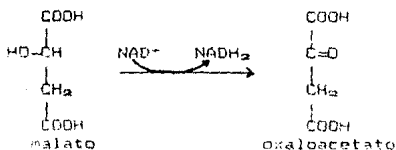


El fumarato realiza la oxidacion de los aminoacidos tirosina y fenilalanina. Es oportuno mencionar que cuando el producto vegetal es dañado, las enzimas TAL (tirosina amonoliasa) y PAL (fenilalanina amonoliasa) se activan, lo cual da como resultado el pardeamiento al producirse las melanoidines en una serie de reacciones llevadas a cabo secuencialmente.

El fumarato es convertido a malato por una reaccion reversible de hidratacion-deshidratacion catalizada por la enzima fumarasa que no requiere de ningun coenzima.



Por último, el cuarto paso oxidativo del ciclo ocurre cuando el malato es convertido en oxaloacetato, reacción catalizada por la malato deshidrogenasa dependiente del NAD.



En cuanto al balance energético, por cada molécula de piruvato oxidado a acetil CoA y por las tres oxidaciones ligadas al NAD⁺ en el ciclo, se obtienen un total de 12 ATP. Además la oxidación del succinato ligada al FAD genera 2 ATP más y la regeneración de CoA a partir de succinil-CoA genera un ATP. Por consiguiente, la síntesis total de ATP por cada vuelta del ciclo (la oxidación de una molécula de piruvato a CO₂ y H₂O) es de 15 ATP, o 30 ATP por molécula de glucosa.

Así, en la combustión completa de una molécula de glucosa a CO₂ y H₂O se producen 38 moléculas de ATP (8 de glucólisis y 30 del ciclo de Krebs) lo cual representa 262 kcal/mol de glucosa es decir, la eficiencia celular está alrededor del 36.4 %. Casi un 64% se pierde como calor y es utilizado para operar el sistema o sea para mantener un balance de intermediarios favorables y las

reacciones puedan efectuarse eficientemente.

10.4.1 Control del ciclo de Krebs.

Existen algunas controversias para definir si el control del ciclo de Krebs podría ser llevado a cabo de manera similar al de la glucólisis (punto 10.3.2.1). tal parece que además de ser controlado por las enzimas y los niveles de ATP y ADP, la concentración de los intermediarios también toma parte.

En términos generales, el control respiratorio o control por el aceptor efectuado por las concentraciones relativas del ADP fundamentalmente, ATP y fosfato del medio exterior. Su nivel es lo que influye para saber a qué ritmo va a actuar el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. La velocidad máxima de consumo de O_2 se logra cuando se suministra abundante sustrato respiratorio, las concentraciones de ADP y de fosfato en el medio son elevadas y la concentración de ATP es baja. Por el contrario, el flujo mínimo (5-10 % del flujo máximo) se obtiene cuando las concentraciones de ATP es elevada y las de ADP o de fosfato son casi nulas. Específicamente donde intervienen en el ciclo de Krebs se precisa a continuación.

Se ha encontrado que la aconitasa es estimulada por ADP y P_i e inhibida por el ATP, NADH y monofluorocitrato.

La citrato sintetasa es inhibida por ATP y por NADH. además cataliza la conversión del monofluoroacetil-CoA en

monofluorocitrato. Este ultimo es un potente inhibidor de la aconitasa.

La isocitrato deshidrogenasa necesita al ADP como activador y al ATP y NADH como inhibidores.

El ATP provoca una disminucion en la afinidad del fumarato por la fumarasa, causando inhibicion al ser la concentracion de fumarato menor que la saturante.

En cuanto a los intermediarios del ciclo, se ha observado que al acumularse el oxalacetato puede inhibirse a si mismo a partir del succinato, ya que es un inhibidor competitivo. Debido a la similitud de la estructura de la succinato deshidrogenasa y es mucho mas efectivo que el malonato.

El citrato, isocitrato y α -cetoglutarato actuan como moduladores alostericos positivos de la carbonilacion del acetyl CoA en la sintesis de acidos grasos. Pero tambien, el citrato puede actuar como modulador negativo especifico de la fosfofructoquinasa (principal enzima reguladora de la glucolisis) en consecuencia, retarda tanto el ritmo de la glucolisis como a su vez el suministro de acetyl-CoA.

La succinato deshidrogenasa es una enzima de tipo alosterico, se activa con fosfato, succinato y fumarato.

Lehninger afirma que el control no es efectuado por la concentracion de sustratos respiratorios tales como piruvato. Contrariamente, Atkinson (1977) menciona que la respiracion puede ser regulada por la disponibilidad del sustrato a la

mitocondria.

Apoyando a Atkinson, en varios estudios se ha observado que el transporte de malato en mitocondria de maiz es mas rápido que el piruvato, desde luego, esta aseveración es muy relativa puesto que de alguna manera la oxidacion de los intermediarios del ciclo de Krebs dependen del estado de desarrollo del producto hortofruticola.

Dizengremel et. al. (1982) así como Theologis y Laties (1981) experimentando con papa, zanahoria y betabel, en estados tempranos de madurez, demuestran que dichas especies siguen similar patrón oxidativo (aun y tratadas con etileno) existiendo mayor oxidacion del succinato que de malato, pero al acercarse a la senescencia, se invierte el resultado.

En mitocondrias aisladas bajo condiciones que se favorece tanto el transporte electronico maximo como la velocidad de fosforilacion, el oxigeno consumido por NADH endógeno o exógeno o succinato, parece estar solo limitado por las deshidrogenasas de la cadena respiratoria. Al adicionar un segundo sustrato estimula el consumo de O_2 . Por otra parte, cuando el sustrato inicial es un ácido organico, la estimulacion es mayor que cuando el NADH es adicionado como segundo sustrato (Day y Wisnick, 1977). Este estudio lo que sugiere es que la cadena respiratoria solo se satura cuando simultaneamente el NADH es oxidado junto con la actividad del ciclo de Krebs. Esto soporta las observaciones previas de Frenbairn y Fennert (1957) quienes mencionan que en

algunos casos ocurre la oxidación completa de ácidos individuales a CO_2 y H_2O , lo cual de acuerdo a lo anterior podría darse durante el "ripening" (ver estado del desarrollo del fruto u hortaliza en el punto 12).

Por último, Hall J.L. et. al, citan que la velocidad de O_2 consumido se incrementa considerablemente por la adición de algún intermediario del ciclo de Krebs.

10.5 Sistema de transporte de electrones.

Las reacciones oxidativas de la célula para producir energía concluyen precisamente en el sistema de transporte de electrones.

A grosso modo estriba en la oxidación del compuesto intermediario del ciclo de Krebs o algún otro sustrato exógeno al ciclo con la cesión de dos átomos de hidrógeno en la reacción. Los iones hidrógeno pasan al citoplasma, mientras que los dos electrones que posee el hidrógeno fluyen a través de una serie secuencial de nucleótidos de piridina, flavoproteínas y citocromos con potenciales de oxidación-reducción cada vez menores. hasta reducir al último aceptor electrónico en la respiración, el oxígeno molecular con formación de agua.

Durante este proceso denominado fosforilación oxidativa, se conserva gran parte de la energía libre de dichos electrones en forma del enlace fosfato del ATP, en sitios específicos de la cadena respiratoria,

conocidos como sitios de acoplamiento, donde la oxidación se acopla a la fosforilación.

Sin embargo, este sistema no es tan sencillo como parece, ya que se complica en vegetales apareciendo una bifurcación designadas como rutas convencional y alternante, que operan bajo mecanismos específicos.

10.5.1 Ruta convencional.

El esquema propuesto más reciente (1986) sobre la ruta convencional, se contempla en el diagrama 17.

El par de electrones y de iones H^+ provenientes de los pasos oxidativos del ciclo de Krebs; isocitrato-oxalosuccinato, α -cetoglutarato-succinil CoA, malato-oxaloacetato, succinato-fumarato (ver diagrama 15) así como otros exógenos al ciclo, son tomados dentro de la matriz mitocondrial (en algunos casos en la membrana mitocondrial externa) por aceptores de hidrógeno, los nucleótidos de piridina. Generalmente los nucleótidos de piridina se refieren al dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) o coenzima I, pero a veces al fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADP⁺) o coenzima II.

Dicho par de electrones y de iones H^+ transferidos al NAD⁺ son reducidos a NADH+H⁺. Luego tales pares pasan a la enzima flavina (situada en la membrana mitocondrial interna) ya sea el mononucleótido de flavina (FMN) o el dinucleótido de

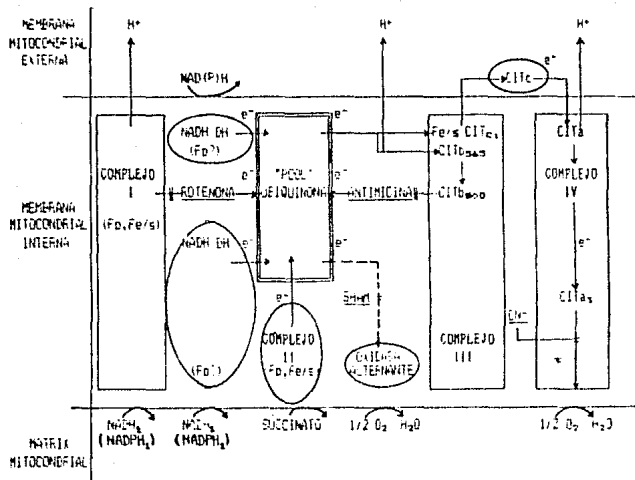


DIAGRAMA 17. SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES A TRAVES DE LAS RUTAS CONVENCIONAL Y ALTERNATE.
203

flavina adenina (FAD) reduciendola.

Puesto que la energía requerida para reducir al FAD es algo menor a la energía liberada por oxidación del $\text{NADH}+\text{H}^+$, el exceso es utilizado para sintetizar una molecula de ATP , ubicada en el complejo I .

El complejo II lo constituye el paso oxidativo succinato-fumarato, donde los susodichos pares directamente son transferidos al FAD. Es la única reacción del ciclo de Krebs que no emplea NAD^+ .

Posteriormente el $\text{FADH}+\text{H}^+$ reduce a una enzima que contiene hierro-no heme acoplado a grupos Fe-S o S-H, volviendo a reducirse hasta nivel de ubiquinona. En este "pool" de ubiquinona convergen todos los sustratos iniciales reducidos.

Los electrones de la ubiquinona van a dividirse reduciendo 3 vías:

1. A la ruta alternante , abordada despues (indicada en el diagrama 17 con una linea - - -) .

2. Al citocromo b_{558} , mismo que a su vez reduce al citocromo b_{560} . Este ultimo reduce un compuesto fenolico a su correspondiente quinona, la ubiquinona.

La reducción y oxidación del citocromo se realiza por la adición o remoción de un electrón, en la parte con hierro de la molecula, pasando de valencia +2 a +3 y viceversa.

3. A otra enzima conteniendo hierro-no heme acoplado a grupos Fe-S y esta a su vez reduciendo al citocromo c₁.

Del "pool" de ubiquinona a las dos últimas vías citadas, localizadas en el complejo III, de nuevo dos iones hidrógeno se liberan de la cadena de transporte electrónico, por medio de la operación del "ciclo Q de proton matriz" (Moore y Rich, 1985), el cual reduce la ubiquinona donando un electrón tanto a la proteína Fe-S como al citocromo b_{558} : liberándose energía suficiente para sintetizar una segunda molécula de ATP por cada 2 electrones transferidos.

Después el citocromo b_1 reduce al citocromo c , que se encuentra en la membrana mitocondrial externa, y este a su vez al citocromo a en la membrana mitocondrial interna y de ahí al citocromo a_3 , generándose en el complejo IV un tercer ATP, por cada 2 electrones transferidos.

El citocromo a_3 es el único elemento de la cadena que se sabe puede reaccionar con el oxígeno molecular. Los citocromos a y a_3 forman una asociación molecular llamada citocromo c oxidasa, aun no separada químicamente. Las dos enzimas parecen operar independientes, pero los experimentos han demostrado que pueden modificar mutuamente su acción química. Además del hierro presente en cada uno de ellos, estos dos citocromos se caracterizan por la presencia, en ambos, de un átomo de cobre.

Finalmente los 2 electrones son transferidos a un átomo de oxígeno ($\frac{1}{2} O_2$) junto con $2 H^+$ para producir H_2O , completando así la transferencia de electrones desde el alto nivel energético que tenían en la molécula combustible inicial hasta el bajo nivel que

tienen en el agua.

10.5.2 Ruta alternante.

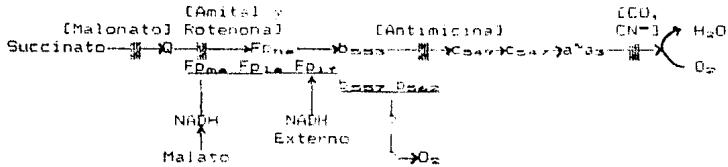
Durante varias décadas se ha investigado sobre la denominada ruta alternante, que opera como mecanismo compensatorio de la ruta convencional del citocromo, por la cual los electrones reducidos de los sustratos del ciclo de Krebs, fluyen hasta el O_2 .

El primer investigador que sugiere su existencia es Okunuki (1939), después confirmada por James y Elliott (1955), al demostrar que las mitocondrias aisladas de Arum maculatum, fueron capaces de oxidar los sustratos del ciclo de los ácidos tricarbónicos en presencia de cianuro (CN^-).

Pero no fue sino hasta 1971, que Schonbaum et. al, caracterizaron a la ruta alternante como resistente al CN^- , sensible a hidroxamatos, ya que además observaron que podía inhibirse por ácidos hidroxámicos sustituidos por un grupo aril [de los cuales el ácido salicilhidroxámico (SHAM) es el más frecuentemente empleado].

Aunque numerosos estudios han sido dedicados a ésta ruta, permanece desconocida la naturaleza química exacta. Antes se especulaba que el punto de ramificación entre ambas rutas era el sitio del citocromo tipo b (Yocum y Hackett, 1957; Bendall y Bonner, 1971).

Hall J.L. et. al (1974) proponen una probable ruta respiratoria en mitocondrias vegetales, la cual se ejemplifica a continuación:

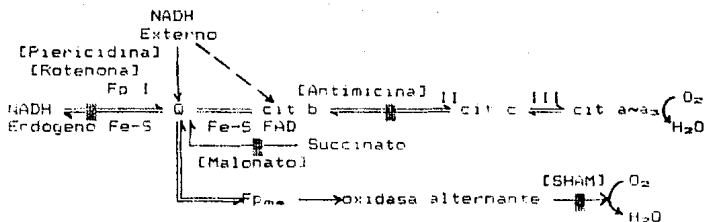


Según Storey (1970) la terminología de las 4 flavoproteínas se basa en su potencial redox (h=alto, m=medio, l=bajo) y entre las más definidas, tienen las siguientes diferencias de potencial (E₀'):

	Fpna	Fpmb	Fp1a	Fp1b
a pH=7.2 E ₀ '	-110	+10	-70	-155 mV.

Sin embargo, mas tarde los citocromos tipo b fueron reconocidos como contaminantes, por lo tanto se descartaron (Bonner, 1973).

Así, atendiendo a los cambios de potencial oxid-reducción se llega a la conclusión que el punto de ramificación es por la ubiquinona o coenzima Q. El siguiente esquema lo muestra.



en donde: I, II y III, indican los sitios de fosforilación; Fp, flavoproteína; Fe-S, proteína hierro-sulfuro; Q, ubiquinona y [] inhibidores.

De acuerdo a lo anterior, no existen evidencias aun que soporten el papel de la flavoproteína (Fp_{ma}).

Por otra parte, la inhibición de la ruta por los hidroxamatos quelatados con hierro (un átomo de hierro retenido entre dos átomos de la misma molécula) quie a proponer que la proteína Fe-S podría estar involucrada, pero tampoco se ha identificado ninguna por resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Sin embargo, hay ciertos aspectos relacionados con la ruta que son generalmente aceptados.

La ruta alternante es un componente integral de la membrana interna, sugiriendo que la integridad de la membrana es esencial para su operación.

Desde 1957 por Yocum y Hackett se conoce la existencia de las oxidasas terminal convencional (citocromo oxidasa) y

terminal alternante resistente al CN^- (oxidasa alternante). Bonner et. al (1984) han caracterizado a esta ultima como una proteina conteniendo Fe con un peso molecular aparente de 33000. No obstante, en lo reportado, utilizando técnicas espectroscopicas (optica o EPR), ningun substrato ha podido ser atribuido a la oxidasa alternante.

Comunmente se cita que la oxidasa alternante tiene una significativamente baja afinidad por el oxigeno comparada con la oxidasa citocromo sensible al cianuro de la ruta principal, lo cual es indudablemente cierto, puesto que los valores de $K_m O_2$ son de 1 a 2 μM y 0.1 μM , respectivamente. Asi que, podria esperarse que la reduccion de O_2 a traves de la ruta alternante se da independiente de la concentracion de O_2 , en base al intervalo normal detectado en estudios de respiracion (Solomos, 1977).

El producto de la reduccion de O_2 por esta ruta es H_2O y no un superoxido o peroxido de hidrogeno (H_2O_2) [Downie y Garland, 1973; Hug y Palmer; 1979; Siedow, 1982].

El diagrama 17 muestra la localizacion y los componentes del sistema de transporte electrónico por ambas rutas, la convencional del citocromo, ya explicada, y la alternante resistente al cianuro.

Como puede observarse dado que los electrones del " pool " de ubiquinona son bifurcados, dos sitios de conservacion de energía, indicados por la translocalización de protones en los complejos III y IV, son desviados de la ruta alternante.

Bastantes investigadores no encuentran ninguna evidencia que soporte algún sitio fosforilativo entre la ubiquinona y el oxígeno de la ruta alternante; por lo tanto, gran cantidad de la energía liberada durante la transferencia de electrones, la cual podría almacenarse en ATP, se pierde como calor.

Algunos otros la consideran que no puede ser totalmente no fosforilativa, sin embargo, esto puede deberse a la dificultad de la utilización de inhibidores combinados, dado que se presenta en algunos casos inhibición competitiva. Entonces, ya que los electrones provenientes del ciclo de Krebs vía NADH interno pasan a través del complejo I, una tercera parte del ATP normalmente producido durante la oxidación del piruvato puede, en teoría, ser sintetizado cuando los electrones del NADH interno fluyen en presencia de la ruta alternante (Moore y Rich, 1985) y algún inhibidor del complejo III. O bien, podría variar la producción de ATP, siendo mayor si se emplea cianuro o por la disposición de un non-fosforilativo NADH deshidrogenasa de la superficie de la membrana mitocondrial interna (Palmer y Ward, 1985).

Esta ruta parece ser resistente a la rotenona, un inhibidor del complejo I.

De esta manera, como la ruta alternante es por si misma no fosforilativa, la oxidación de los substratos del ciclo de Krebs, puede conducir a la síntesis limitada de ATP.

La regulación del sistema de transporte electrónico puede depender de alguna manera del NADH exógeno, el cual de acuerdo al

estudio de Wu y Laties (1983), utilizando papa como material de experimentación, puede provenir de la α -oxidación de los ácidos grasos llevada a cabo en el retículo endoplásmico.

Como se aprecia en el diagrama 18, el NADH reduce al oxaloacetato en el citoplasma por medio de la deshidrogenasa citoplásmica. El malato producido entra a la mitocondria mediante el transportador dicarboxilato y es oxidado a oxaloacetato (OAA) por la malato deshidrogenasa mitocondrial y de ahí a la cadena respiratoria (STE) (140). El oxaloacetato formado dentro de la mitocondria regresa al citoplasma según Day y Wisnitch (1981). La sensibilidad a la rotenona indica que se efectúa la oxidación del NADH intramitocondrial y la sensibilidad a los inhibidores malonato y butilmalonato denotan el transporte del malato dentro de la mitocondria.

Este proceso podría ser asociado con la participación de la ruta alternativa debido a que la α -oxidasa de ácidos grasos " per se " es relativamente resistente al cianuro (140). Además puede relacionarse con el daño por frío si se toma en cuenta que los ácidos grasos aparecen de la degradación de las membranas (Theologis y Laties, 1980) y conforme al estudio de Jacobson et. al (1970) los sustratos respiratorios, en papas desacopladas de la fosforilación oxidativa, muestran ser principalmente de naturaleza lipídica. Otra evidencia, podría sustentarse considerando que el proceso descrito de Wu y Laties puede ocurrir en ausencia de la operación del ciclo de Krebs, que probablemente

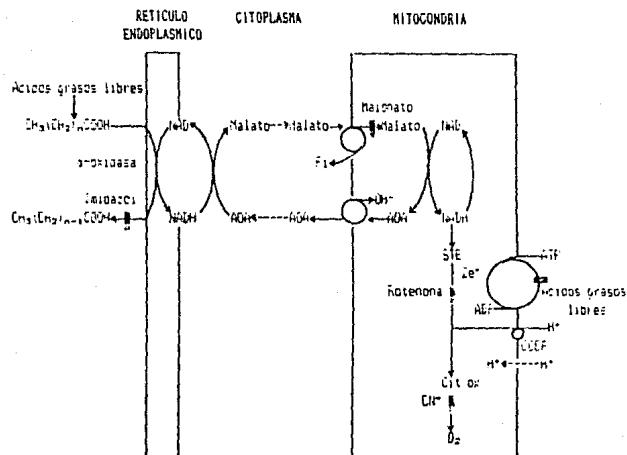


DIAGRAMA 18. REGULACION DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MEDIANTE LA α -OXIDACION DE ACIDOS GRASOS.

se da en los productos hortofrutícolas enfiados, ya que existe acumulación de intermediarios y una baja en la actividad respiratoria.

En atención a los estudios de Day y Lambers (1983) también el sistema de transporte electrónico podría depender de la provisión de malato vía glucolisis. El fosfoenolpiruvato se convierte mediante la fosfoenol piruvato carboxilasa a oxaloacetato y este a su vez a malato con malato deshidrogenasa citoplásmica. El malato entra a la mitocondria ayudado por el transportador dicarboxilato y contrariamente a lo sugerido por Wu y Laties, proponen que es descarboxilado por la enzima málica mitocondrial enlazada al NAD. (20).

Puesto que la actividad de la enzima málica predomina cuando se presenta una baja concentración de ADF, como ocurre en estados de maduración avanzados donde se observa con mayor actividad la respiración resistente al CN^+ (25), la vía citada por Day y Lambers podría resultar viable bajo estas condiciones.

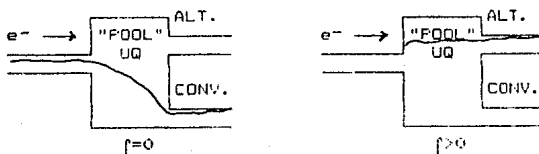
Por otra parte, en algunos reportes de recientes años, atribuyen la liberación de O_2 resistente al cianuro a la actividad asociada con la enzima lipoxigenasa (Siedow, 1982). La lipoxigenasa cataliza la adición de una molécula de O_2 a la doble ligadura de ciertos ácidos grasos insaturados (por ejemplo del ácido linoleico). La lipoxigenasa es resistente al CN^+ , sensible al SHAM. Sin embargo, algunos argumentos posteriormente expuestos excluyen la posibilidad que la lipoxigenasa sea la causa

de la ruta alternante en mitocondrias aisladas (Siedow, 1982; Douce, 1985).

Rustin et. al (1984) describieron un ciclo radical peroxiacido graso, que podria explicar el incremento en la liberacion de O_2 , asociada con la ruta alternante.

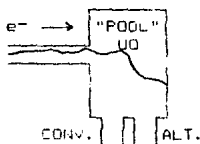
En lo que concierne a la regulacion del flujo de electrones, dos modelos han sido propuestos para describir la manera en que los electrones en el " pool " de ubiquinona se distribuyen entre las rutas principal y alternante.

Bahr y Bonner (1973) inicialmente presentaron un modelo en el cual sugieren que la ruta alternante solo esta ocupada cuando el estado Redox del " pool " de ubiquinona es suficientemente bajo (por ejemplo cuando la concentracion de ubiquinona reducida es alta). para permitir la oxidacion de ubiquinol por la oxidasa alternante, termodinamicamente favorecida. Asi, los electrones son " vertidos " en la ruta alternante unica y exclusivamente si la ruta principal llega a saturarse.



MODELO DE BAHR/BONNER (1973).

En un segundo modelo, Toomstemberg y Nyns (1978) proponen la partición de electrones entre las rutas, basado en las constantes de velocidad relativa para la reacción entre la ubiquinona reducida y las 2 rutas.



MODELO DE TOOMSTEMBERG/NYNS (1978).

Cottingham y Moore (1983) observaron la cinética de acuerdo al segundo modelo, cuando cada una de las rutas, ya sea la principal o alternante fueron inhibidas y los electrones solo fluyeron a través de la ruta que permanecía. Sin embargo, en defensa del modelo de Bahn y Bonner, algunos resultados muestran que sin la adición de inhibidores la operación de las secuencias varía según el avance de la madurez, siendo en los frutos más cercanos a la senescencia, mayor la operación de la ruta alternante (es.124,125,126). También Day y Lambers (1987) apoyan al modelo de Bahn/Bonner, puesto que en sus resultados, la ruta alternante solo es ocupada cuando el citocromo es inhibido por FCCF (p-trifluorometil carbonilcianuro) fenil hidroxal).

Luego entonces, la ruta alternante representa un conducto para el " exceso de energía " requerido para oxidar sustratos celulares durante el crecimiento o como respuesta a las

condiciones adversas en el almacenamiento (Palmer, 1976; Lambers, 1980).

Experimentalmente, dicho concepto se comprueba al observar que la ruta alternante en raíces llega a operar cuando el abastecimiento de carbohidratos excede la capacidad del órgano de la planta para metabolizar todo el carbono entrante (Lambers-1980). En hojas de trigo y espinaca, Arzon-Bicdo et. al (1982) encontraron que la ruta alternante no fue ocupada en la mañana cuando los niveles de carbohidratos fueron bajos, pero después de algunas horas de fotosíntesis, la velocidad respiratoria se incrementó y la ruta alternante fue ocupada.

10.5.3 Inhibidores del sistema de transporte electrónico.

De acuerdo a los resultados de las investigaciones utilizando diferentes compuestos para determinar su efectividad como inhibidores del sistema de transporte electrónico, se ha encontrado que la Lencilaminopurina (BA), ácido hidroxámico (SHAM) y disulfiram, actúan en sitios independientes inhibiendo la ruta alternante. El propilgalatril inhibe en el mismo sitio que el SHAM. Dichas aseveraciones están basadas en los estudios de Ditzgen et. al (1982) en donde observan que la combinación de tales compuestos muestran inhibición no competitiva, sin embargo, en presencia de KCN presenta inhibición competitiva entre ellos. (21)

En cuanto a los derivados de adenina la variación en la efectividad de inhibición de la ruta alternativa resulta:

bencilaminopurina y 7-bencilamino-8-acetilpurazol (4, 10);
diantrina, antiticoquinina, ψ - ψ' -dimetil- α -il-adenina o
7-bencilamino-8-bencilpurina y cinetina (adenina). Lo cual se ha
atribuido a la liposolubilidad como factor indicativo del efecto
inhibitorio.

Se sugiere que los derivados de adenina con alta
liposolubilidad podrían entrar en la membrana mitocondrial e
interactuar con un receptor hipotético en un área lipofílica,
conduciendo a la interrupción de la ruta de transporte de
electrones resistente al CII¹²¹.

Por otra parte, algunos estudios sobre inhibidores han
estado enfocados al papel que juega la síntesis de proteínas en
la respiración resistente al cianuro. Así, la ciclohexamida (CH),
un inhibidor de la síntesis de proteínas induce la operación de
la ruta alternativa. Mientras que el cloramfenicol no estimula el
desarrollo de la ruta alternativa, por lo que se presume que la
perturbación crítica en la síntesis de proteína se efectúa extra-
mitocondrial. (107).

De los hidroxamatos, en especial el ácido m-
clorobencilhidroxámico (CLAM) se ha demostrado que el sitio
específico de inhibición es el centro Fe-S más que Cu. (117, 124)

La antimicina y el 2-heptil-4-hidroxiquinolina N-óxido
(HOQNO) inhiben de la misma manera al complejo III. (124)

Entre los inhibidores de las partículas F_1 , el venturicidin, oligomicina y DCCF han mostrado ser efectivos; así como el etrapetin en las partículas F_1 -ATFasa.

Además del cianuro (CN^-), el FCCF [p-trifluorometoxi (carbonilcianuro) fenil hidroxonal, tiocianato y el 8-hidroxiquinolina, inhiben la ruta del citocromo.

Algunos otros inhibidores y su sitio se muestran en el diagrama 17.

10.5.4 Determinación del flujo de electrones a través de las rutas convencional y alternante.

La determinación del flujo de electrones en cada una de las rutas, se obtiene mediante la cuantificación del O_2 consumido, en la presencia del respectivo inhibidor es decir, para la ruta alternante (V_{alt}) se emplea cianuro (CN^-), mientras que para la ruta del citocromo (V_{cit}) un adecuado ácido hidroxámico: ácido salicilhidroxámico (SHAM) o ácido m-clorobencilhidroxámico (CLAM). Así, el flujo total (V_T) estará dado por:

$$V_T = V_{alt} + V_{cit}$$

Bahr y Bonner en 1973, introducen un análisis detallado para estimar la contribución por ambas rutas. Para la ruta alternante se adiciona CN^- y luego es determinada por análisis volumétrico

(titulación) con ácido hidroxámico.

Los valores de la titulación así obtenidos son representados por $g(i)$ e indica la posible máxima actividad de la ruta alternante en presencia de una concentración dada de hidroxamato.

La titulación se repite en ausencia de CN^- para obtener V_T a cada concentración de hidroxamato.

Se grafica V_T contra $g(i)$ y da una línea recta, lo cual denota que al variar el flujo de la ruta alternante, la ruta convencional no se afecta, por lo que se obtiene:

$$V_T = f g(i) + V_{alt}$$

La intersección u ordenada al origen representa la actividad de la ruta del citocromo f que es la pendiente, la fracción de la ruta alternante que opera a r inhibidores. El flujo de la ruta en ausencia de inhibidores V_{alt} es $f g(i)$.

Cuando la ruta alternante opera a su total capacidad, $f = 1$. Y si no hay contribución a la V_T por la V_{alt} , $f = 0$ y la gráfica V_T vs. $g(i)$ da una línea horizontal.

Ahora bien, si la ruta del citocromo estuvo operando menos del máximo y la inhibición con hidroxamatos de la ruta alternante desvió electrones a la ruta del citocromo entonces, la V_{alt} podría no ser una constante y la gráfica V_T vs. $g(i)$ puede que no dé una línea recta, excepto si toda la ruta alternante fue desviada a la ruta del citocromo, en éste caso dará una línea horizontal, $f = 0$.

Debido a que normalmente ambos sistemas de transporte

electrónico no operan completamente, para la estimación de la contribución de cada ruta en ausencia de inhibidores, se ha contemplado una respiración residual (V_{res}), refiriéndose a aquella insensible a los inhibidores de las rutas alternante y citocromo. En consecuencia se tiene que:

$$V_T = V_{alt} + V_{cit} + V_{res} \quad 0$$

$$V_T = f(q^{10}) + V_{alt} + V_{res}$$

Otra estimación de la ruta alternante puede obtenerse por medio de la comparación de la relación ADP/O sin y con la más alta concentración de inhibidores, ya que la ruta alternante no contribuye con ATP con succinato como sustrato.

Con todas las pruebas ya determinadas por los técnicas convenientes con la estimación de datos (titulados), confirman que los electrones no son desviados de la ruta alternante a la del citocromo, adicionando hidroxamatos.

La ruta alternante no opera durante el estado 3, pero llega a ser empleada totalmente durante el estado 4, luego entonces, la ruta alternante es gobernada por la ruta del citocromo.

Los electrones de la ruta del citocromo son desviados a la ruta alternante por las siguientes razones:

- Presencia de Antimicina, CN⁻ o cualquier otro inhibidor semejante.

- Que se sature la ruta del citocromo.

- Falta de ADP (estado 4).

La capacidad de las rutas así como el potencial oxid-

reduccion de la ubiquinona y flavoproteina varia en funcion del tejido en particular.

En presencia de Malonato, se reduce la inhibicion por SHAM y puede contribuir la ruta alternante.

10.5.5 Eficiencia fosforilativa.

La eficiencia fosforilativa de la mitocondria involucra la cuantificacion del ATP formado y el O_2 consumido. La determinacion del oxigeno consumido se lleva a cabo manometricamente, pero debido a que no puede determinarse por periodos cortos (menos de 10 min.) es sustituido por otra tecnica empleando electrodos.

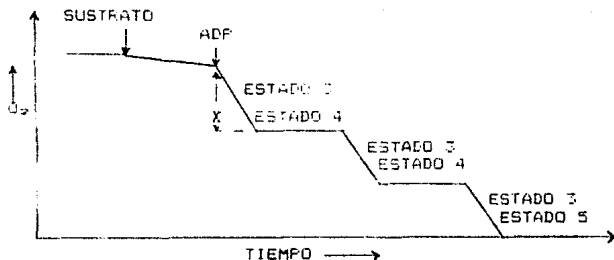
En la practica la eficiencia fosforilativa, se evalua mediante la adicion de sustrato a las preparaciones mitocondriales y utilizando algunos parametros que pueden ser indicativos como se explica a continuacion.

Se ha denominado ESTADO UNO cuando se reduce el O_2 lentamente, sin la adicion de sustrato en las preparaciones mitocondriales; el ESTADO DOS es determinado en la presencia de ADP pero sin la adicion de sustrato; el ESTADO TRES se obtiene con la adicion de ADP en un medio con sustrato, P_i (fosfato inorganico) y Mg^{+2} (cofactor de la fosforilacion oxidativa) provocando incremento inmediato del O_2 consumido y el decline cuando todo el ADP ha sido fosforilado a ATP: la consecutiva

velocidad más baja es el ESTADO CUATRO y el ESTADO CINCO en la presencia de sustrato y ADF pero en ausencia de O_2 . En forma resumida se aprecia en el siguiente cuadro.

ESTADO	SUSTRATO EN EL MEDIO	ADF	OXIGENO
1	-	0	+
2	-	+	+
3	+	+	+
4	+	0	+
5	+	+	0

Representados graficamente se tendrían:



Luego entonces, la relación:

$$RCR = \frac{\text{ESTADO TRES}}{\text{ESTADO CUATRO}}$$

es indicativa del acoplamiento de la oxidación a la fosforilación. El RCR significa la relación del control

respiratorio o relación de control por el aceptor. Generalmente este valor en mitocondrias vegetales va de 2 a 10 mientras que en mitocondrias animales es muchísimo más elevado de 20 o de 60 a 70.

Belitser (1940) mostro que podia formarse mas de una molecula de ATP a partir de ADP y fósforo, durante la transferencia de cada par de electrones desde el sustrato al oxígeno, encontrando que la relacion P/O (fosfato inorganico recuperado en forma orgánica por atomo de O₂ consumido) era de 2 o superior. Tal relacion es identica a ADP/O (cantidad de ADP fosforilado por atomo de O₂ reducido) ya que guardan una relación estequiométrica de 1:1.



Por lo tanto, el O₂ consumido al estar asociado a ciertas cantidades de ADP puede ser calculado por la distancia X (ver anterior representación gráfica).

10.5.6 Factores acoplantes.

Cuando las mitocondrias han perdido su habilidad para producir ATP, pero aún conservan su capacidad de transportar electrones desde el sustrato hasta el oxígeno, puede ser restaurada dicha habilidad por factores acoplantes.

Entre los mas importantes está la ATPasa conocida como F₁ (Racker, 1970) que es insensible a la oligomicina y otra

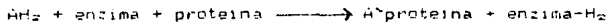
proteína F_0 , combinada con una proteína particular (F_1) que le confiere sensibilidad a la membrana mitocondrial o a la fracción fosfolipídica ante la oligomicina.

El efecto contrario se logra con los desacoplantes, es decir, su presencia en el tejido provoca que la respiración continúe normalmente o sea estimulada, pero no se lleva a cabo la fosforilación acoplada del ADP al ATP, debido a que permeabilizan a la membrana mitocondrial al paso de protones, lo cual no permite la formación del gradiente de potencial y consecuentemente no se sintetiza el ATP durante la transferencia de electrones. Entre éstos se encuentran el 2,4 dinitrofenol (DNF), dicumarol, fenilhidrazonas del cianuro de carbonilo y salicilamidas, entre otros.

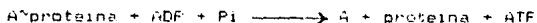
10.6 Hipótesis sobre el acoplamiento entre el sistema de electrones y la fosforilación oxidativa.

La explicación del mecanismo de síntesis del ATP, ha sido y será el reto de los científicos, puesto que hasta la fecha ninguna hipótesis está comprobada.

La hipótesis química involucra la formación de intermediarios de alta energía con un hipotético factor acoplante (posiblemente una proteína), al reducirse un elemento del sistema de transporte de electrones.



Luego, la energía del enlace proteína-substrato es usada para sintetizar ATP.



Todo este proceso tendría lugar en cada uno de los sitios de acoplamiento, sin embargo no se ha aceptado debido a que los intermediarios nunca han sido aislados, es difícil explicar con ella la acción de los desacoplantes y la fosforilación oxidativa solo es producida en la membrana mitocondrial intacta.

Por otra parte, la hipótesis de las cargas apareadas móviles requiere que los electrones se muevan a través de las membranas siguiendo canales específicos paralelos bajo la influencia del gradiente electroquímico, que genera interacciones coulombicas entre los transportadores electrónicos e iones cargados positivamente, encapsulados en moléculas proteicas llamadas ionóforos. Una vez más, las estructuras requeridas son hipotéticas y la evidencia que soporta ésta no es muy sólida.

La hipótesis que ha tenido aceptación general es la quimiosmótica establecida por el bioquímico británico, residente en los Estados Unidos, P. Mitchell (1968), la cual se fundamenta en la separación de cargas por la cadena respiratoria, en la reacción:



hidrógeno ión hidrógeno

Las dos partículas cargadas se separan por lados opuestos de la membrana de la mitocondria mediante enzimas que transportan

los electrones al interior y el hidrogeno al exterior (Ver diagrama 19). Ademas, los atomos de hidrogeno transportados a traves de la membrana deben derivarse de las reacciones:



Como resultado de esto en la membrana interna se acumulan iones hidroxilo y en la externa iones hidrogeno, generando una diferencia de potencial que tiende a reunir fuertemente entre sí a los componentes del agua sin embargo, la membrana interna es impermeable a tales iones. Pero, existe una via por la que los iones hidrogeno pueden penetrar (solo cuando están presentes el ADF y P_i) las partículas F_0 acompañado del arreglo de las partículas F_1 -ATPasa (ver diagrama 1). Ante la influencia de la elevada diferencia de potencial, dos intermediarios hipoteticos, I e I' (uno de los cuales se supone es un sitio activo en la ATPasa) forman un enlace anhídrico que actua removiendo el oxigeno de los grupos hidroxilo del P_i . El oxigeno y los iones hidrogeno procedentes del exterior se unen para formar agua (lado inferior izquierdo del diagrama). Ademas, los iones hidrogeno del ADF y los del grupo hidroxilo del P_i se combinan con los grupos hidroxilo derivados del proceso de transporte electronico descrito, formando agua (lado inferior derecho del diagrama). Asi, los radicales ADF y P_i se unen produciendo ATP.

El efecto de los desacoplantes puede explicarse en funcion de su efecto sobre la permeabilidad de las membranas, dado que es

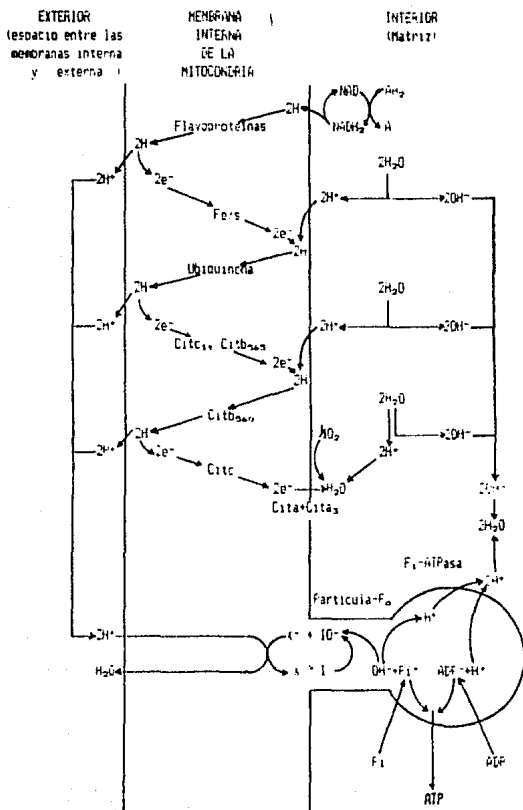


DIAGRAMA 19. HIPÓTESIS SOBRE EL ACOPLAMIENTO ENTRE EL SISTEMA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.

incrementada y los iones hidrogeno la atraviesan nulificando la diferencia de potencial con formacion directa de agua y por ende no se produce ATP.

Luego entonces, cuando los productos hortofruticolas sufren daño por frio, ocurre el cambio del estado fisico de las estructuras de membrana por efecto de la misma baja temperatura, incrementando la permeabilidad de membranas con la consecuente fuga de iones (explicada en el punto 6.2), lo cual de acuerdo a lo anterior puede disminuir la diferencia de potencial establecida y actuar como desacoplantes.

11. POSIBLE MECANISMO DEL DAÑO POR FRIO.

El daño por frio en los productos vegetales se presenta como un proceso " set back " o sea como el inverno del desarrollo, por esta razon el mejor entendimiento tanto de las causas fisiologicas y bioquimicas, como de los mecanismos de resistencia (revisados con detalle en el punto 10), podrian permitir diseñar adecuadas practicas culturales, generar el desarrollo de cultivares mas resistentes e implementar mecanismos con los cuales se logre el mejoramiento de la calidad de los frutos u hortalizas conservados en fresco, mediante el empleo de las bajas temperaturas.

En atencion a lo cual, el proposito de abordar el presente punto es el de integrar el resultado de las investigaciones mas

convincentes para proponer un posible mecanismo del daño por frío durante el enfriamiento de productos hortofrutícolas sujetos a un periodo de exposición prolongado.

Al poner en contacto los productos vegetales con el medio de enfriamiento, los frutos u hortalizas al tener mayor temperatura ceden su calor al medio, que la tiene mas baja, hasta que ambos alcanzan la misma temperatura o equilibrio termico.

Durante este proceso de transmision del calor, se observa distension de los tejidos debido a que en las celulas, las moleculas mas proximas al medio circundante es decir, las que constituyen las estructuras de pared y plasmalema experimentan cambios.

El efecto fisiologico esta dado por los cambios en la membrana celular, puesto que la función principal de la pared es mecanica o sea, de soporte.

Los microtúbulos involucrados en el movimiento o alineacion de proteínas integrales en el plano de la membrana sufren despolimerización, restringiendo la difusion libre lateral de tales proteínas y aunado al cambio de estado de los lípidos, del líquido cristalino a sólido gel, dan por resultado la disminucion severa de la fluidez del plasmalema. Además ocurre alteracion en la actividad de las enzimas enlazadas a la membrana.

Todo ello conduce a la desorganización de las estructuras celular y subcelular, puesto que dicha membrana circunda a todos los organelos.

La viscosidad protoplasmática se incrementa, suspendiendo el flujo a través de ella, por lo tanto, perturba el flujo metabólico al punto que se pierde la compartimentación (definida en 5.1).

La pérdida de la compartimentación altera directamente la actividad enzimática o indirectamente al desequilibrar la regulación de la expresión genética que guía a la desnaturalización proteica. Así mismo, contribuye en el desbalance de los reguladores de crecimiento (ver 6.1 y 13.), influyendo en la disminución de la actividad respiratoria.

Por otra parte, dentro de la desorganización subcelular referida, existe incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, propiciando la liberación de iones.

De acuerdo a la teoría quimiosmótica, la fuga de iones a través de la membrana, actúa como desacoplante del sistema de transporte electrónico concomitante a la fosforilación oxidativa, guiando a la disminución y abastecimiento del ATP requerido para el mantenimiento de la organización celular, en ése momento un mecanismo compensatorio, denominado ruta alternante, opera.

La ruta alternante insensible al cianuro, una derivación del sistema normal del transporte electrónico, al no generar ATP puede ser un camino rápido para reciclar nucleótidos de piridina (NAD y NADP), los cuales son necesarios para continuar el metabolismo. Sin embargo, como el flujo por esta ruta es menor que la convencional del citocromo, provoca disminución en la

actividad respiratoria.

Ademas, la fuga de iones citada, influye en la perdida de la compartimentacion. asi como en el desbalance de cofactores que a su vez alteran la actividad enzimatica. Esta ultima provoca que algunas reacciones se presenten de manera anormal, por ejemplo la disolucion de los compuestos pectinicos insolubles, expresada como ablandamiento de los tejidos, por efecto del incremento en la actividad de la pectinesterasa; u otras reacciones queden inoperantes, presentando acumulacion de metabolitos intermediarios, principalmente aquellos substratos que proveen el mayor abastecimiento del proceso respiratorio en condiciones normales, es decir, los carbohidratos. En consecuencia, los acidos grasos provenientes de la degradacion de la estructura de membrana, llegan a ser los primordiales substratos respiratorios bajo estas condiciones. Todo esto, tambien contribuye a la disminucion en la actividad respiratoria.

La gran demanda de nucleotidos de piridina requeridos para continuar el metabolismo, el deficit de ATP y oxigeno, la acumulacion de intermediarios del ciclo de Krebs y glucolisis, asi como, la acumulacion de metabolitos caracterizados como toxicos, por ejemplo, los acidos clorogenico, shiquimico y cafeico, conducen a la respiracion anaerobica. Los productos principales de este tipo de respiracion, el alcohol etilico y acetaldehido, influyen en el desempeño de la actividad enzimatica y en exceso interfieren en las trayectorias metabolicas normales.

El mismo hecho del ATP depauperado y la liberación de iones, en especial de calcio, desorganiza aun mas las estructuras celular y subcelular. For añadidura, se altera la actividad enzimática, ya que la maquinaria enzimática celular esta montada o asociada de una forma u otra con las membranas. Cerrándose con ésto último el ciclo.

Así, todos los desordenes mencionados, son expresados finalmente mediante el síndrome visual del daño por frio.

Se aclara que tal síndrome puede ser exacerbado dependiendo de otros factores indicados en el punto 12. ademas de que el mecanismo de daño por frio propuesto, no contempla el "hardening" (ver punto 13).

Las interrelaciones de los elementos que participan en el mecanismo propuesto, pueden visualizarse claramente en el diagrama 20.

Exposición del fruto u hortaliza a temperaturas bajas por periodos prolongados

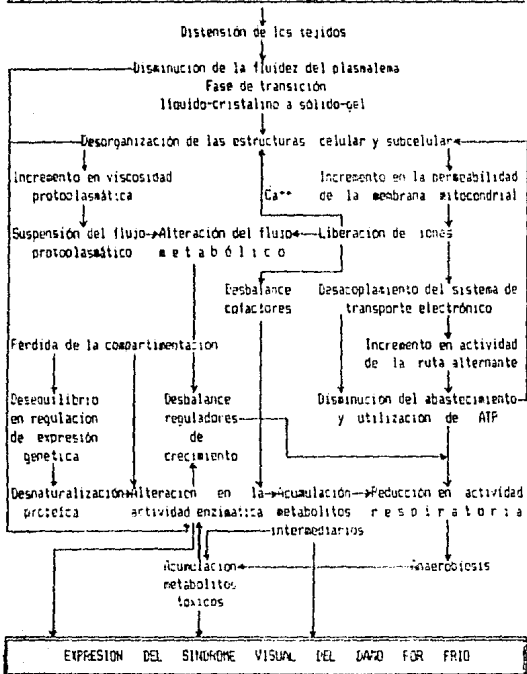


DIAGRAMA 20. POSIBLE MECANISMO DEL DAÑO POR FRIO DURANTE EL EMPERFIAMIENTO DE FRUTOS U HORTALIZAS EXPUESTOS POR PERIODOS Prolongados.

Fuente: Descripción realizada por Ana María Neaves Fernández.

12. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA INCIDENCIA DEL DAÑO POR FRÍO.

Puesto que la cosecha finaliza el intercambio de materia entre el fruto u hortaliza y el resto del vegetal, la tendencia del producto como sistema biológico independiente formado por tejidos vivos, es la de continuar todos los procesos vitales. (140)

Consecuentemente, estos productos exhiben considerable actividad química, en la que los procesos respiratorios juegan un papel importante. Bajo condiciones aeróbicas, las frutas u hortalizas continúan respirando (absorbiendo O_2 y expeiriendo CO_2) y oxidando su reserva de carbohidratos. La mayor parte de la energía liberada se desprende como calor. Se producen numerosos cambios químicos y su gran mayoría influyen directamente en la calidad. (145, 146, 147)

Muchos de esos cambios se hallan interrelacionados con la respiración.

Así que, el propósito del almacenamiento refrigerado es reducir al mínimo la tasa a la que se efectúan tales procesos, debiéndose procurar que las condiciones de almacenamiento sean las adecuadas y propias para cada producto, pues de otro modo se incurre en procesos perjudiciales como: el alargamiento del individuo por ejemplo en espárrago, zanahoria y betabel; si la humedad es elevada puede ocurrir el enraizamiento concomitante a la descomposición rápida, arrugamiento y agotamiento de las

reservas alimenticias, en especial en raíces y tallos subterráneos; algunas veces en tomate, chayote o papaya puede favorecerse la germinación de las semillas dentro de los frutos maduros; cuando se prolonga demasiado el almacenamiento, los ejotes y el maíz pueden endurecerse debido a que se desarrollan tejidos esponjosos, y por último, entre otros, se favorece la aparición de tejidos verdes cuando han sido expuestos a la luz durante el almacenamiento, este proceso puede ser ejemplificado en papa, en donde esas porciones contienen solanina, un glucosido de alta toxicidad, por lo que debe evitarse su consumo.

Por consiguiente, el comportamiento de todos los sistemas biológicos durante su juventud, madurez, senescencia, está por lo regular ampliamente condicionado por el medio.

En el caso concreto de la determinación del comportamiento de los frutos u hortícolas, durante y después del almacenamiento se ha observado que está supeditado por factores pre y post-cosecha, los cuales podrían tener un mayor efecto que el mismo debido al ajuste del medio de almacenamiento, por el que se genera el daño por frío.

Además, tales factores no tan solo modifican el grado de comportamiento a temperaturas bajas sino también el grado de la variabilidad biológica del material experimental considerada como caracteres secundarios (posteriormente se explica).

De tal forma que para precisar la variación del material es necesario que los experimentos se lleven a cabo a cierta escala,

puesto que un numero pequeño de muestra puede no ser representativo. Desde luego, en la practica no es siempre posible debido a las consideraciones de produccion y aun de costos.

Por otra parte, algunos de los tantos factores involucrados, pueden ser controlados, otros no, lo que da lugar a la extensa complejidad del producto final biologico. Una de las razones por las cuales existe gran volumen de informacion contradictoria, contenida en reportes de experimentos de almacenamiento.

Pues bien, dentro de aquellos factores que deben tomarse en cuenta ya que influyen en la incidencia del dano por frio, podrian citarse los siguientes:

- a) Especie-Variiedad
- b) Estado del desarrollo del fruto u hortaliza
- c) Periodo de exposicion-temperatura
- d) Temperatura del fruto
- e) Humedad relativa
- f) Practicas culturales
- g) Luz.

a) Especie-Variiedad.

Debido a que los caracteres que presentan los vegetales son muy diversos y numerosos, por citar algunos de los primarios o esenciales: la fisiologia, citologia, histologia, organografia, así como los caracteres secundarios, considerados de poca importancia, sujetos a constante variacion, por ejemplo: la forma

y tamaño de las células: la forma, tamaño y color de las raíces, de los tallos, de las hojas, de los frutos y de las semillas. Hay necesidad de hacer abstracción de muchos de ellos para poder comprender de manera simplista, el papel que juegan en la determinación de la susceptibilidad al enfriamiento. Para ello se precisa de ubicarlos dentro de la unidad básica taxonómica, la especie inherente a la subespecie o variedad, entendida como los grupos en los que se dividen algunas especies, los cuales se distinguen entre sí por ciertos caracteres secundarios, aunque permanentes. Cabe mencionar que también pueden encontrarse algunos otros grupos que son inducidos por el hombre y que se denominan cultivares.

De esta manera podría establecerse que los requerimientos de temperaturas de almacenamiento difieren entre las diversas especies-variedades. Las temperaturas de almacenamiento inferiores a la óptima de conservación, producen daño por frío, especialmente en productos tropicales, mientras que las condiciones superiores al óptimo reducen la calidad.

En la literatura se ofrecen datos sobre el comportamiento de los productos hortofrutícolas a temperaturas bajas empleados en el diseño de cámaras, algunos de ellos se presentan en la tabla 12.1.

TABLA 1.1 Datos para almacenaje de frutos y hortalizas.

FRUTO U HORTALIZIA	TEMPERATURA PRODUCTO (°C)	TEMPERATURA CAMARA (°C)	TIEMPO PARA QUE *PROD. = *CAMARA (HORAS)	PERIODO ALMACENAJE MAXIMO	HR (1)
Limon	24	14	20	1 - 4 meses	85
Platano (verde)	20	13	12	10 dias	90
Pepono	21	11	24	10 - 14 dias	85
Tomate (maduro)	27	11	34	7 - 10 dias	85
Tomate (verde)	27	11	34	3 - 5 semanas	85
Limon Mexicano	24	8	20	6 - 8 semanas	90
Aguacate	27	4	22	10 dias	85
Piña (madura)	27	4	3	2 - 4 semanas	85
Piña (verde)	27	4	3	3 - 4 semanas	90
Melz (verde)	21	1	24	4 - 8 dias	90
Brócoli	27	1	24	7 - 10 dias	90
Melón Cantaloup	27	1	24	7 - 10 dias	85
Zanahoria	21	1	24	10 - 14 dias	90
Betabel	21	1	24	10 - 14 dias	90
Espárrago	16	1	24	30 dias	90
Coliflor	21	1	24	2 - 3 semanas	90
Durazno	29	1	24	2 - 4 semanas	85
Ciruela	27	1	20	3 - 8 semanas	85
Uva (Este E.U.)	21	1	20	3 - 8 semanas	85
Toronja	24	1	22	6 - 8 semanas	85
Pera	21	1	24	1 - 7 meses	90
Cajadaza	21	1	24	3 - 4 meses	95
Nabo	21	1	24	4 - 5 meses	95
Uva (California)	21	1	20	3 - 6 meses	85
Cebolla	21	1	24	6 - 8 meses	75
Naranja	24	0	22	8 - 10 semanas	85
Hembrillo	27	0	24	2 - 3 meses	85
Manzana	27	0	24	48 meses	87

FUENTE: Principios de refrigeración. Dossat R.J., CEDSA (1981).

Como se puede percatar, solo con esos datos se tiene una idea de como podrian comportarse comparativamente ante la baja temperatura de acuerdo al periodo de almacenaje máximo, pero en ninguna parte mencionan la variedad o en su caso el cultivar y es

de esperarse que la susceptibilidad al enfriamiento variara entre cada uno de ellos, sin embargo en algunos experimentos realizados para revelar si las variedades muestran sensibilidad al enfriamiento cuando son crecidas bajo idénticas condiciones, se obtienen datos contradictorios.

Los resultados concentrados en la tabla 12.2, utilizando pepino como material de experimentación de diferentes variedades crecidas en invernadero en 1962, mostraron diferencias significativas. (3)

TABLA 12.2 Comportamiento de las variedades de pepino crecidas en invernadero ante la baja temperatura.

VARIEDAD	DIAS A 10 °C PARA OBTENER SIMILAR CALIDAD +.
Best Seller	19.3
Butcher	19.7
A.M. 70	20.6
Roa	21.8
Telescope A	23.7
Filia	26.2
Monopol no.55	26.4
Final	26.6
Telescope B	28.7
Green Soot	31.6

Nota: + Pepinos con defectos objetables.

FUENTE: Science et Technique du Froid, Refrigeration Science and Technology, 325-333. (1966).

Pero dos años después, con 7 de las mismas variedades, no se registró ninguna diferencia.

Por otro lado en 1963, con otras variedades de pepino crecidas en el campo, se observaron enormes diferencias estadísticas significativas, como se indica en la tabla 12.3. La calidad D es con similar criterio al anterior experimento descrito, no así las condiciones de enfriamiento, (3).

TABLA 12.3 Comportamiento de las variedades de pepino crecidas en el campo al ser transferidas de 5 a 12.5 °C.

VARIEDAD	DÍAS A 12.5 °C PARA ALCANZAR LA CALIDAD D, MENOS 4 DÍAS A 5°C
Ohio M.F. 200	19
Challenger	17
Cubit	20
Satico	25
Purple's Hybrid	39
Marieter	47

FUENTE: Science et technique du froid, refrigeration science and technology, 125-131. (1966).

Que las diferencias puedan deberse a una respuesta del fruto al estrés, puesto que solo se observan después de un ligero tratamiento de enfriamiento. Si es aplicado un tratamiento severo, tales diferencias no son observadas. Sea o no, esta es la razón que explique la diferencia en susceptibilidad al enfriamiento entre las variedades de cierta especie, las condiciones de almacenamiento recomendadas pueden indicar por simple inspección la tolerancia de algunas variedades de una misma especie a temperaturas bajas, por ejemplo en melón o desde

otro punto de vista, como en el caso de las variedades de ciruela mantenidas a similares condiciones de almacenamiento, la sensibilidad al enfriamiento se aprecia por su vida de anaquel (122,141). En la tabla 12.4 se indica.

TABLA 12.4 Condiciones de almacenamiento recomendadas para algunas variedades.

ESPECIE	VARIEDAD	TEMPERATURA (°C)	VIDA DE ANAQUEL (SEMANAS)
Plátano	Latundan (maduro)	12,8	1,5
	Latundan (verde)	10,6 - 13,4	1,0
	Cavendish (maduro)	12,8	1,5
	Manchó (maduro)	7,2 - 10,0	1,5
Ciruela	Alu Bokharo	0 - 1,7	2,0
	Savitaa y Pubio	0 - 1,7	3,0
	Shiro y Hale	0 - 1,7	4,0
Naranja	Valencia	4,4 - 6,1	5,0 - 6,0
	Switon	8,9 - 10,0	4,0 - 5,0
	Ponkan	4,4	3,0 - 4,0
	Sathoud	5,6 - 7,2	16,0
Mango	Carabao	7,2 - 10,0	2,5 - 3,5
	Picc	7,2 - 10,0	2,5
	Sadam	8,3 - 10,0	4,0
	Rasouri	5,6 - 7,2	6,0
Melón	Cantaloup	1,7 - 3,3	1,5
	Honeydew	7,2	4,0 - 5,0

Nota: La humedad relativa en todos los casos oscila entre el 85-90 %, con excepción de la naranja 'Valencia' que comprende el intervalo de 88-92 %.

FUENTE: Fisiología de la postcosecha, manejo y utilización de frutas tropicales y subtropicales. Fantastico ER. B., CECSA (1979).

Ahora, por lo que respecta al cultivar se ha observado que los síntomas se manifiestan diferente entre cada uno de ellos (Pierson et. al, 1971).

Así, Bramlage (1982) informa que en manzanas, en la Mc Intosh predomina el pardeamiento del corazón (brown core); en Yellow Newtown descomposición interna (internal breakdown); en Cox's Orange Pippin oscurecimiento interno y del pericarpio (LTB); en Grimes Golden ablandamiento y oscurecimiento de la cascara (soggy breakdown) y en Jonathan Australiana tanto escaldado suave (soft scald) como oscurecimiento interno y del pericarpio (LTB).

En papas, solo ciertos cultivares como Chippewa y Sebago manifiestan oscurecimiento cobrizo (mahogany browning).

Mientras que en peras, aun cuando no se consideran especies sensibles al enfriamiento, algunos cultivares Europeos muestran oscurecimiento interno (internal browning) a temperaturas inferiores a 5 °C.

En términos generales de acuerdo a la susceptibilidad al daño por frío se establece que las hortalizas de hoja (col de bruselas, col, lechuga) pueden almacenarse a 0 °C; las hortalizas de fruto (maíz dulce, tomate, pepino, pimiento, calabaza, jitomate) de 4.4 a 10 °C; las hortalizas cuyas partes comestibles se desarrollan bajo tierra: raíces (betabel, zanahoria, nabo, rabano), tuberculos (papa, alcachofa de Jerusalem, Arames), bulbos (ajo, cebolla) y rizomas (jengibre), generalmente se manejan a -0.5 a 0 °C. Mientras que para los frutos, las temperaturas óptimas para una

maduración homogénea y el desarrollo de buen sabor, gusto excelente y color atractivo de la corteza. en la mayoría de los frutos quedan en el intervalo de 10 a 25 °C, aunque para la preservación de algunas como la uva, granada y manzana se requieren temperaturas menores de 0 a 5 °C.

Numerosos estudios han sido realizados con la finalidad de encontrar cuál es la causa de la diferencia en susceptibilidad al enfriamiento de las diversas especies-variedades.

Anteriormente se mencionó que a su procedencia se le ha atribuido la susceptibilidad al daño por frío, cuando los vegetales han sido expuestos a temperaturas por abajo de los 12.5 °C aproximadamente y superiores al punto de congelación de los tejidos.

Los que provienen de zonas tropicales o subtropicales son los más sensibles a la temperatura crítica. bajo este criterio es considerada como la temperatura en la que ocurre la fase de transición del estado líquido-cristalino a sólido-gel de la membrana (70,73). Este cambio de estado disminuye la permeabilidad de la membrana y altera la actividad de las enzimas asociadas a ella. los cuales provocan trastornos en el metabolismo, denominados daños por frío. (73).

En tanto que las especies que proceden de zonas templadas son las más resistentes y pueden ser expuestas a ciertas temperaturas de enfriamiento durante un periodo prolongado sin suscitarse ningún daño.

Por otro lado, la procedencia de las especies ha sido relacionada con la flexibilidad de la membrana que a su vez está asociada con la proporción relativa de ácidos grasos saturados e insaturados, ya que la fase de transición de la membrana a temperaturas bajas, está determinada en un amplio grado por la composición de los ácidos grasos y la posición de los mismos en la estructura carbonada del glicerol de los fosfolípidos. (71,72,134)

La mayor insaturación de los ácidos grasos se detecta a la más baja temperatura de la fase de transición. Esta relación guía a los investigadores para sugerir que los vegetales resistentes o tolerantes al enfriamiento podrían tener un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que los sensibles al enfriamiento y que al adaptarse los vegetales a dicha temperatura de enfriamiento, el grado de insaturación de los ácidos grasos podría incrementarse. Esto ha sido expresado en la hipótesis "adaptación homeoviscosa".

La hipótesis establece que muchos organismos mantienen su óptima viscosidad de membrana y funciones, en respuesta a la variación de la temperatura al alterar la proporción de sus ácidos grasos en sus fosfolípidos, lo cual podría participar en la regulación de la actividad de las enzimas enlazadas a la membrana, particularmente en el mantenimiento apropiado de la velocidad de reacción, cuando las células están a diferentes temperaturas (116). Lo que coincide con la hipótesis de que la

sensibilidad al enfriamiento de los frutos hortícolas, puede variar durante el día dependiendo del cambio en la composición de las membranas, para mantener una viscosidad constante a las diferentes temperaturas.

Luego entonces, las especies con membrana rígida por contener más ácidos grasos saturados que insaturados, le confiere mayor sensibilidad al enfriamiento y son en los que ocurre el daño más severo porque es de la fase de transición en la membrana, en tanto las especies resistentes son aquellas que poseen membrana flexible con mayor cantidad de ácidos grasos insaturados. El grado de insaturación no siempre está correlacionado con la resistencia al enfriamiento, porque el brócoli y la papa (especies tolerantes al frío, tuvieron una relación más baja de ácidos grasos insaturados comparados respectivamente con soja y cañote, consideradas como especies sensibles al enfriamiento. En consecuencia, se ha planteado que otros factores podrían estar involucrados en la regulación de la fluidez de la membrana, como serían otros componentes de la membrana tales como esterol y colesterol, o bien el complejo lípido-proteína (para mayor detalle ver el punto 5.1 y 6.3).

Sin embargo, evidencias recientes han obligado a reconsiderar la hipótesis de la fase de transición de la membrana, las críticas provienen de dos puntos básicos diferentes:

- Primero.- los análisis bioquímicos de la composición de

ácidos grasos de las membranas muestran que los niveles elevados de ácidos grasos insaturados que se encuentran en muchas membranas, podrían impedir la fase de transición de los lípidos en el intervalo de temperatura donde sucede el daño por frío.

- Segundo.- los análisis de las discontinuidades reportadas en las gráficas de Arrhenius podría deberse a una reordenación gradual a causa del amplio intervalo de temperatura en el que se realizaron los experimentos. (23).

Otros han cuestionado si los cambios en la membrana son debidos a la modificación de la proteína enlazada a la membrana, puesto que se han observado discontinuidades en las gráficas de Arrhenius en la actividad de algunas enzimas solubles.

b) Estado de desarrollo del fruto u hortaliza.

La duración y la tasa de desarrollo durante las 4 etapas diferentes: juventud, sazón, madurez y senescencia, varían en función del producto hortofrutícola.

El estado de desarrollo tiene una marcada influencia sobre la tasa respiratoria y la vida de almacenamiento.

Se ha observado que frutos como: aguacate, albaricoque, ciruela, chirimoya, durazno, granadilla, higo, mango, manzana, melocotón, melón, papaya, pera, plátano, tomate, zapote, etc., que tienen la característica de adquirir la madurez de consumo después de haber sido cosechados (una vez obtenida la madurez fisiológica o estado sazón), exhiben un incremento súbito en su

patron respiratorio durante la maduracion. Estos han sido denominados, climatericos. (149, 153, 154)

En tanto, un segundo grupo que incluye a los frutos u hortalizas tales como: cereza, col de bruselas, esparraño, fresa, higo, lechuga, limon, naranja, pepino, piña, pomelo, toronja y uva, entre otros, han sido designados como, no climatericos, por adquirir su madurez de consumo en el arbol y por consiguiente despues de cosechados no presentan ningun cambio violento en su actividad respiratoria (149, 153, 154). Quizas tales frutos se hallan en fase posclimaterica al ser recolectados, puesto que Aharoni (1968) y Kurata y Miyashita (1971), mostraron que las frutas citricas jovenes, pequenas, registraban despues de la cosecha un aumento en la respiracion y en la produccion de etileno, lo cual no fue observado en frutas citricas maduras. (149)

Los tallos y raices separados de la planta, normalmente respiran de manera uniforme o bien presentan gradual disminucion respiratoria al iniciarse la senescencia, cuando las condiciones del medio son constantes. (145)

En la grafica 10 se puede observar el comportamiento respiratorio, propuesto por Biale (1964), que ofrece los tipos de frutos, durante sus fases de crecimiento y desarrollo.

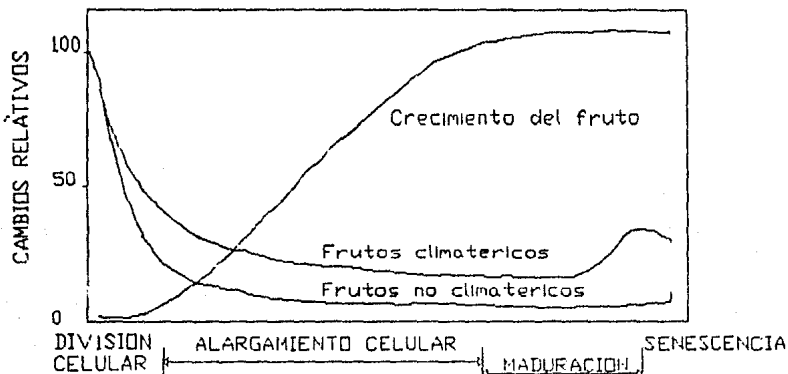
El periodo del climaterio, es decir en donde ocurre el incremento subido de la respiracion, es visto como una indicación del termino natural de un periodo de sintesis, de mantenimiento y

del comienzo de la senescencia del fruto (12). Durante este, se produce el madurado, definido como un proceso en donde el fruto alcanza las mejores características sensoriales (color, textura y sabor) como sucede en el tomate, plátano, mango, aguacate, etc., o puede presentarse poco después del mismo cuando el fruto se muestra en las etapas de madurez plena a demasiado maduro, como en el durazno (13,14).

Otro criterio importante para distinguir entre frutos climatericos y no climatericos, es la respuesta a la aplicación de etileno. El etileno (C₂H₄), un hidrocarburo gaseoso producido naturalmente por los frutos, tiene un efecto que provoca el incremento de la respiración en los mismos. Bajo este planteamiento, Biale (1960), demostró que un fruto no climaterico reacciona al tratamiento con etileno en cualquier etapa de su vida en la pre-cosecha o en la pos-cosecha, mientras un fruto climaterico solo muestra respuesta respiratoria si el etileno es aplicado en su edad preclimaterica o inmaduro, acelerando el comienzo del climaterio asociado a los cambios del "ripening" y se vuelve más insensible al tratamiento después de la iniciación del ascenso climaterico (15,16).

Sin embargo, no se han demostrado claras diferencias metabólicas entre ambas frutas. La distinción podría ser considerada provisional hasta contar con mayor información en cuanto al establecimiento de una comparación entre los cambios transicionales de los estados "mature" a "ripe" (15).

GRAFICA 10. Patron respiratorio de frutos durante sus fases de crecimiento y desarrollo.



FUENTE: Freenfriamiento de frutas y hortalizas. Saucedo V.C. U.A.CH. (1981).

De manera general, en frutos no climatericos, no se aprecia un periodo lag entre " maturation " y " ripening " que pudiera distinguirlos, en cambio en frutos climatericos al apreciarse el " ripening ", proceso acompañado del climaterio, ésta característica se aprovecha para obtener una mejor calidad comercial y mayor vida de almacenamiento, ya que pueden ser cosechados previo al inicio de la elevacion respiratoria.

Durante el " ripening " se pueden caracterizar varios

estados: preclimaterio, mínimo climaterico, elevación climaterica, pico climaterico y posclimaterio, de acuerdo al comportamiento respiratorio del fruto. (5)

Frecuentemente en la literatura, el concepto de " ripening " lo consideran como una manifestación de senescencia, representada como un estado final de diferenciación, en la que se desorganiza internamente la célula. Durante este actúan varias hidrolasas degradando la clorofila, almidón, pectina, etc. Pero también es un proceso directo que requiere de las enzimas específicas responsables de la síntesis de compuestos fosforilados de alta energía, etileno, pigmentos, constituyentes del sabor y quizás polipéptidos, entre otros (Bain y Mercer, 1964; Vanner, 1965; Sacher, 1967; Frenkel et. al, 1968; Hulme et. al, 1968). (15)

Es evidente que los cambios fisiológicos son más complejos en frutos climatericos, ya que nunca maduran por completo en el árbol, pasando por una crisis climaterica, en otras palabras, una resistencia al " ripening " y maduran hasta cuando se les ha separado de él, como pasa con el aguacate. No obstante, Spencer (1960), sugiere que los cambios bioquímicos asociados con la maduración pueden ser similares a los de los frutos no climatericos, pero la escala de tiempo de los eventos puede ser diferente. Tal como el caso del melón, originalmente fue considerado no climaterico, pero tiempo después Lyons et. al (1962) y Mc Glasson y Pratt (1964), observaron que muestra un comportamiento típico de los frutos climatericos, presumiblemente

debido a que los cambios en los no climatéricos ocurren más lentamente en un periodo prolongado, en tanto los climatéricos en un periodo corto. (124, 125)

En consecuencia, como lo indicaron Hulme et. al (1964), la distinción entre ambos tipos de frutos, puede ser más aparente que real, puesto que la mayoría de las situaciones de trato, tales como daños mecánicos y exposición a temperaturas extremas, pueden dar como resultado la súbita elevación de la actividad respiratoria, aunque no exista un aparente climaterio autónomo. (126)

Luego entonces, dado que en el proceso de desarrollo del fruto u hortaliza, el comportamiento respiratorio asociado con el grado de madurez, está mejor definido en los frutos climatéricos, es precisamente en éstos en los que se ha estudiado la susceptibilidad al enfriamiento.

Todos los investigadores coinciden en que el estado maduro es el más tolerante al daño por frío, con excepción del estudio del platano. A continuación se describen los experimentos que lo demuestra.

Trabajando con aguacate variedades Hass y Fuerte , Kosiyachinda y Young (1976), encontraron que la etapa menos sensible fué el posclimaterio, en donde el fruto pudo ser almacenado a 2 °C por 6-7 semanas y los estados más sensibles fueron el preclimaterio o en la elevación climaterica con una sensibilidad relativamente alta, incrementándose al máximo en el

pico climaterico, cuando el fruto mostr6 da#o despu6s de 19 d#as de tratamiento a 2 °C. (10, 134)

Por otra parte, Mukerjee y Srivastava (1979), observaron que una maduraci6n parcial de mango reduce la sensibilidad al da#o permitiendo almacenarlos a 5 °C por 8-10 semanas, sin da#o considerable. Este resultado puede ser interpretado de acuerdo a la observaci6n clara de Hane y Marcellin (1978) en donde establecen que la composici6n de los acidos grasos de la mitocondria cambia conforme el fruto madura. Lo cual coincide con las teor#as comunes de estructura y funci6n de la membrana, ya comentadas. (10)

Otros investigadores como Nazeeb y Broughton (1978), Akamine (1959), Anisumi (1956), utilizando papaya como material de experimentaci6n, (10); Mc Colloch y colaboradores (1966) con tomate, (134); y Lipton (1975) con mel6n Honey Dew tambi6n encuentran que los frutos en estado sa#on (estado de madurez previo al inicio del " ripening " o proceso de maduraci6n) son los m#s susceptibles al da#o por fro que los frutos maduros.

No obstante, el comportamiento contrario se halla en pl#tanos segun Fantastico, Grierson y Soule (1967). Los frutos en los racimos apicales, menos maduros, fueron menos susceptibles al da#o por fro que los frutos maduros producidos m#s distantes del centro, pero las diferencias son m#nimas. (10, 134)

Buena pues, aunque los frutos maduros puedan tolerar

temperaturas más bajas comparadas con los inmaduros. su vida de almacenamiento disminuye, tal como se indica en la tabla 12.5.

TABLA 12.5 Condiciones de almacenamiento para algunos frutos en función de su estado de desarrollo.

FRUTO	ESTADO DE DESARROLLO	TEMPERATURA (°C)	VIDA DE ANAQUEL (SEMANAS)
Plátano	Lacatan verde	12.8 - 15.6	4.0
	Lacatan maduro	12.8	1.5
	Latundan verde	14.4 - 15.6	3.0 - 4.0
	Latundan maduro	12.8 - 14.4	1.0
	Cavendish verde	12.8 - 14.4	3.4
Piña	Cavendish maduro	12.8	1.5
	Totalmente verde	8.3 - 10.0	4.0 - 6.0
Pistacho	25 % madura	4.4 - 6.7	1.0 - 2.0
	Verde	7.2	3.0 - 5.0
	Maduro	5.6 - 7.2	2.0

Nota: La humedad relativa en todos los casos es del 85 %.

FUENTE: Principios de refrigeración. Dossat R.J., CECOSA, México (1981).

Puede incrementarse la vida de anaquel de los frutos maduros, incrementando la temperatura, por ejemplo: el limoncito verde y amarillo almacenados de 11.1-12.3 °C duran 7 y 8 semanas respectivamente.

Por otra parte, los frutos maduros, requieren de menor humedad relativa si son almacenados a la misma temperatura que los inmaduros, para obtener el mismo tiempo de almacenaje. Esto se aprecia con plátanos almacenados por 10 días a 12.3 °C, los verdes requieren 92 % de humedad relativa, en tanto los maduros 87 %.

Sin embargo, en algunos productos completamente maduros, puede incrementarse su vida de almacenamiento con tan solo mantenerlos a temperaturas mas bajas. Es el caso de los tomates, los cuales resultan comestibles, de buen color, pero suaves. Si se someten a 7.2 °C duran 7-10 dias, en cambio a 0 °C pueden tenerse hasta 42 dias, manteniendo en ambos casos la misma humedad relativa del 85 %.

c) Período de exposición-Temperatura.

Entre otros factores, la susceptibilidad de los frutos u hortalizas al daño por frio, involucra tanto a la temperatura como a un aunado factor decisivo, el tiempo de exposición.

La alteración fisiológica puede presentarse durante el almacenamiento o bien, al ser transferidos los vegetales de la temperatura de enfriamiento a temperaturas superiores:

1. Durante el almacenamiento.

En estudios de almacenamiento, Apeland (1966) informa la vida de almacenamiento de pepinos " Ohio M.R. 200 " expresada en dias para alcanzar la calidad 3, mantenidos a diferentes temperaturas.

Dentro de la escala que contempla el color, la calidad y el grado de daño a intervalos fijos, la calidad 3 corresponde a pepinos considerados malos, es decir, aquellos que contienen defectos objetables, entre otros valores que denotan:

9 - excelente, recién cosechado.

7 - bueno, solo ligeros defectos.

5 - regular, presenta defectos pero no son seriamente objetables.

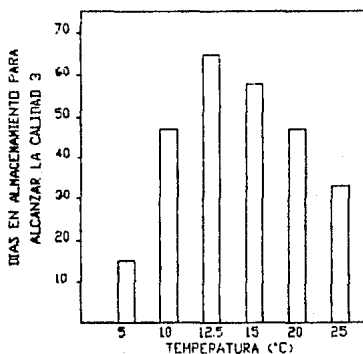
1 - raro, bajo "condiciones comunes".

Los pepinos fueron seleccionados y clasificados uniformemente en cuanto a tamaño, color y estado de desarrollo. La gráfica 11 ilustra los datos obtenidos.

De acuerdo a los resultados, la temperatura de almacenamiento óptima es la de 12.5 °C. Por abajo de esta temperatura se reduce la vida de anaquel debido a que se manifiesta el daño por frío, con síntomas tales como manchas acuosas si la humedad relativa es elevada o si es baja, aparece el picado, y por arriba de la misma temperatura, es decir a 15 °C, a pesar de que tienen una vida ligeramente superior comparada con los mantenidos a 5 o a 10 °C, los pepinos presentan amarillamiento y empezando desde el centro del fruto, ablandamiento. (3)

Por otro lado, fantástico al experimentar con plátanos "Lacatan" expuestos a baja temperatura después de haberlos cortado del tallo, resultaron dañados en un lapso de 2 hrs. a 1.1 °C, 4 hrs. a 7.2 °C y 36 hrs. a 10 °C. (14)

GRAFICA 11. Vida de almacenamiento de pepinos variedad " Ohio M.R. 200 " a diferentes temperaturas.



FUENTE: Science et Technique du Froid. Refrigeration, Science and Technology. 325-336 (1966).

2. Almacenados a temperaturas bajas y luego transferidos a temperatura mas elevada.

Ahora bien, la severidad del daño en productos hortofrutícolas que han sido transferidos a temperatura ambiente (20 °C), esta estrictamente relacionada con la temperatura y el periodo de almacenamiento, tal como lo demuestran Liang Yu et. al (1982) en su estudio experimentando con pepino. (22)

Ellos almacenaron los pepinos a varias temperaturas 3, 9, 11

y 13 °C. y para cada temperatura variaron el tiempo de almacenamiento en 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días (representado en cada una de las gráficas), observando posteriormente el índice de daño una vez que fueron transferidos a 20 °C. Las gráficas 12 muestran los resultados obtenidos.

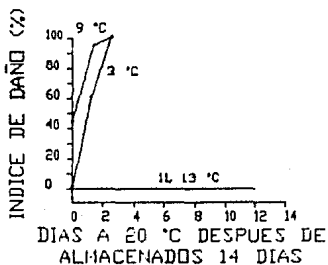
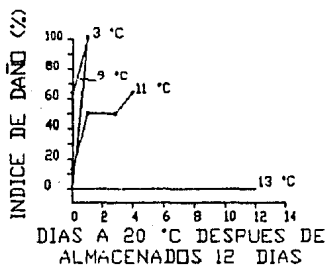
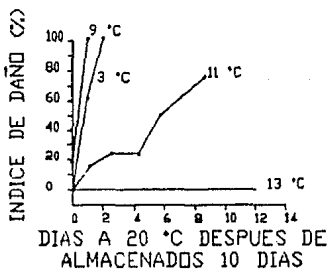
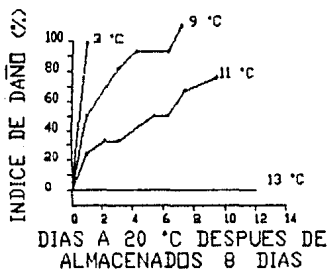
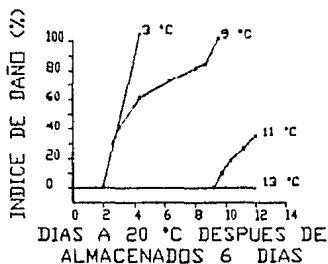
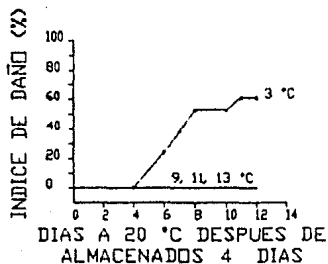
Puede apreciarse que el daño por frío en los pepinos se presenta inmediatamente después al transferirlos a 20 °C. cuando han sido almacenados a 5, 9 u 11 ° por 8, 10 o 12 días. Si el período de almacenamiento es menor de los 8 días a cualquiera de las temperaturas probadas, el daño observado a temperatura ambiente puede ocurrir en algunos días. (44)

Conforme a los resultados obtenidos a grosso modo se deduce:

- Primero.- Al extraer los datos de las gráficas para alguna temperatura como por ejemplo a 9 ° se tiene:

Días de almacenamiento a 9 °C.	Días a 20 °C después de permanecer a 9 °C por los respectivos días.	% Daño
5	10	100
8	7	100
10	1	100
12	1	100
14	1	100

GRAFICAS 12. Relacion entre el periodo de almacenamiento y temperatura de pepinos transferidos a 20 °C.



FUENTE: Institut International du Froid, 247-251 (1982).

A los 4 días de almacenamiento a 9 °C no coincide la gráfica.

Por lo tanto, mientras mayor sea el tiempo de almacenamiento a cierta temperatura baja, menor será el tiempo a temperatura ambiente para que se presente el daño por frío con mayor severidad.

- Segundo.- Después de periodos prolongados de almacenamiento, la severidad del daño por frío es inversamente proporcional a la temperatura al que han sido expuestos los frutos. Esto se basa en la comparación de los resultados de las gráficas, por ejemplo: a los 12 días de almacenamiento a 7, 9, 11 y 13 °C, en el primer día después de transferidos a 20 °C se observa un índice de daño del 100, 100, 50 y 0 %, respectivamente.

Estos datos confirman los de Scott y Hawes (1949) al demostrar que los tomates color rosado que fueron almacenados a 0 °C durante 6 días y luego se dejaron madurar por completo a 22.2 °C, no mostraron señales de daño por frío, pero almacenándolos durante 12 días a 0 °C produjeron mal sabor. (14).

- Tercero.- En algunos casos las temperaturas intermedias ocasionan mayor daño por frío que a temperaturas más elevadas o más bajas. Esto puede observarse en las gráficas de los pepinos mantenidos a 9 °C durante 8, 10, 12 y 14 días, con respecto aquellos a 3, 11 y 13 °C, almacenados en los mismos periodos. Similar caso, se presenta en toronjas Marsh, rara vez se forman cavidades después de un tratamiento de 4 a 6 semanas a

temperaturas de 0 °C o de 10 °C, pero las temperaturas intermedias con frecuencia provocan la formación de cavidades grandes, según cita Fantástico. (111).

d) Temperatura del fruto.

Por la conveniencia de dar a entender de manera secuencial este punto no se inicia propiamente mencionando a la temperatura del fruto.

Así que, las respuestas poscosecha de los frutos u hortalizas al estrés por enfriamiento son frecuentemente influenciadas por las temperaturas del campo (112), vista a través de las fechas de cosecha.

Por esta razón, la ambición de los tecnólogos en el almacenamiento de los productos hortofrutícolas es tener la capacidad para predecir la severidad de los desórdenes poscosecha en base a la predicción del estado atmosférico. (113)

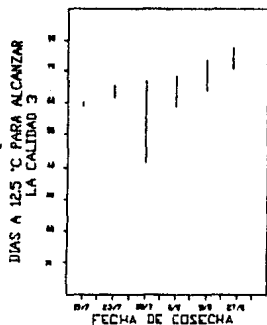
Todo esto ha sido basado en los siguientes trabajos experimentales.

Estudiando la influencia de la fecha de cosecha en la sensibilidad al enfriamiento de pecinos " Ohio M.F. 200 " sujetos 4 días a 5 °C y transferidos a 12.5 °C para obtener frutos con similar apariencia (dentro de su escala corresponden a los malos, con defectos objetables), Apeland (1966) sin comentario alguno reporta la gráfica 13.

En ella puede observarse que con tan solo unos días de

diferencia en el día de la cosecha, la variación de susceptibilidad al enfriamiento es evidente.

GRAFICA 13. Variación de la vida de almacenamiento de pepinos " Ohio M.R. 200 " de acuerdo a la fecha de cosecha.



FUENTE: Science et Technique du Froid. 325-333 (1966).

Kawada et. al (1979) observan que la toronja fué más susceptible en otoño que en la primavera tardía, pero la tendencia en el invierno fué a ser más resistente al daño por frío, indicando que el grado de resistencia al enfriamiento varió considerablemente con las temperaturas del campo. (134).

En otra especie, de manera contraria, Abdel-Maksoud et. al (1974) y Kader et. al (1974), hallaron que los tomates crecidos en invierno fueron más susceptibles al daño por frío que

aquellos en verano. (134)

Las respuestas al enfriamiento de los productos cosechados son afectados con mayor severidad por las temperaturas del campo durante pocas semanas previas a la cosecha que las temperaturas a otros periodos, por ejemplo: las peras 'Anjou' que maduraron (matured) a temperaturas precosecha relativamente frías, mantuvieron mejor su capacidad para madurar (ripening) despues de un prolongado almacenamiento a 0 °C, que aquellas que maduraron (matured) en periodos de temperaturas calientes. (134)

Ahora bien, si la temperatura del campo precosecha cae dentro del intervalo de enfriamiento puede ocurrir el daño antes. Segun Mellenthin y Wang (1971) y Hansen et. al (1971), la temperatura de enfriamiento durante las 4 semanas previas a la cosecha puede inducir maduración prematura y un desarrollo anticipado del deterioro del centro de las peras 'Bartlett'. Similares resultados fueron obtenidos por Van Denburg (1979) en papas 'Russet Burbank', en las cuales una alta incidencia del centro café, fue inducida por 3 semanas de temperaturas frías durante la formación del tubérculo. (134)

Por otra parte, Harvey y Rygg (1936); Grierson (1974) y Purvis et. al (1979), encontraron que la susceptibilidad al daño por frio de la toronja a 4.4 °C es estacional. Cuando los frutos son cosechados en una época temprana (Octubre-Diciembre) o mas tardía (Abril-Junio) generalmente son mas susceptibles que el fruto cosechado a mediados de la estación. Y establecen

que el mecanismo de la resistencia a la mitad de la estación no se conoce pero se sospecha podría estar relacionado con los metabolitos solubles o la actividad metabólica de la cascara. (100)

Más que la temperatura del campo o las fechas de cosecha parece ser que la temperatura del fruto es la que determina el efecto en los vegetales sometidos a baja temperatura. Lo cual queda soportado por los estudios de Saltveit y Cabrera (1987) en sus reportes de experimentos que demuestran que la sensibilidad al enfriamiento de los tomates cambian durante el día. Este cambio es relacionado con la temperatura del fruto y el tiempo de la cosecha.

El tomate en estado sazón fue cosechado a mano a varios tiempos durante el día. Únicamente se seleccionaron frutos sanos, uniformes, sin defectos e ternos. Los tratamientos de temperatura involucraron la transferencia de las bandejas de papel conteniendo a los frutos a las cámaras con temperatura controlada.

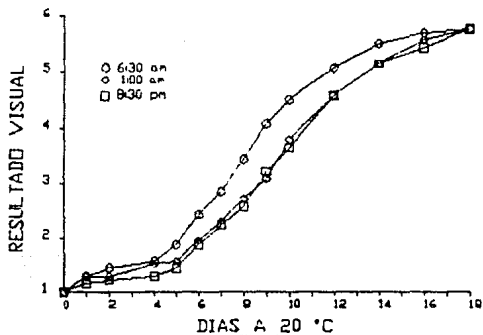
Después de los tratamientos, cada bandeja fue cubierta flojamente con envolturas plásticas para reducir las pérdidas de agua y el fruto maduro a 20 °C.

Periodicamente los tomates fueron marcados para indicar el grado de madurez en una escala subjetiva: 1 para el estado sazón y 6 para rojo maduro. Como índice de daño por frío se utilizó el síntoma de disminución de la velocidad de maduración. En la

grafica 14 se muestran los resultados.

De los frutos enfriados a 7 °C por 7 días, cosechados al amanecer (6:30 AM) de un día soleado, registrando una temperatura de pulpa de 19 °C fueron mas resistentes al enfriamiento (menos daño por frío) es decir, maduraron mas rápido que los cosechados a la 1:00 PM o en el anochecer (8:30 PM) con temperaturas de pulpa de 22 y 29 °C, respectivamente.

GRAFICA 14. Efecto del enfriamiento a 7 °C por 7 días, con subsecuente maduración a 20 °C, en tomates cosechados a diferentes horas en un día soleado.



FUENTE: HortScience 22(3): 452-454. (1987).

Al incrementar el tiempo de exposición a temperaturas bajas o sea 12 días a 7 °C se eliminaron algunas diferencias entre las cosechas.

Para checar si las diferencias observadas resultaron de la cosecha del fruto a diferentes horas del día o a diferentes temperaturas, los frutos fueron cosechados al amanecer (6:30 AM) y 2:30 PM durante días tríos y nublados.

Las temperaturas de los frutos en la mañana y en la tarde fueron casi los mismos (21 y 22 °C, respectivamente). Estadísticamente no hubo diferencias significativas en la velocidad de maduración de esos frutos después de someterlos a 7 °C por 7 días. Los resultados se indican en la gráfica 15.

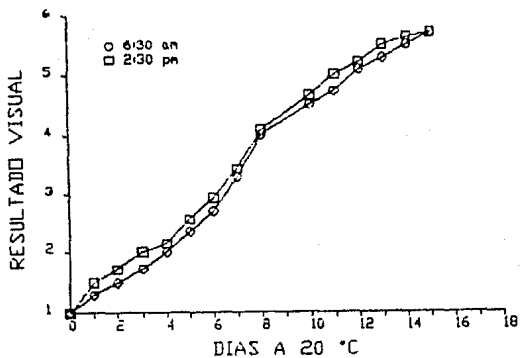
Investigando durante dos años los mismos autores, demuestran que las fluctuaciones en temperatura diurna afectaron la maduración del fruto después del enfriamiento. Se realizaron experimentos en laboratorio, para ver si la sensibilidad al enfriamiento, podría ser afectada por mantener al fruto a diferentes temperaturas previo al enfriamiento.

Los frutos fueron cosechados un poco tarde en la mañana (no especifican la hora) y mantenidos por 7 hrs., unos a 12.5 °C y otros a 37 °C antes de ser enfriados a 2.5 °C.

En la gráfica 16 se observa claramente que los frutos mantenidos a 37 °C por 7 hrs. antes del enfriamiento a 2.5 °C, maduraron más lento que los frutos mantenidos a 12.5 °C antes del enfriamiento.

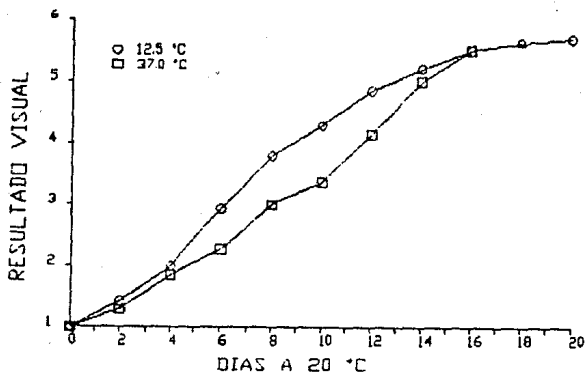
Estos resultados fueron parecidos a los de la gráfica 14.

GRAFICA 15. Efecto del enfriamiento a 7 °C por 7 días, con subsecuente maduración a 20 °C, en tomates cosechados a diferentes horas durante un día frío y rubiado.



FUENTE: HortScience 22(3): 452-454 (1987).

GRAFICA 16. Influencia de la temperatura del tomate en la sensibilidad al enfriamiento.



FUENTE: HortScience 22(3): 452-454 (1987).

Habría que mencionar que al prolongar la exposición del tomate a temperaturas alrededor de los 37 °C es suficiente para inhibir la síntesis de licopeno durante la formación del fruto. Si el tiempo no es tan prolongado a dicha temperatura, no afecta el desarrollo del color significativamente.

Así pues, en base a este último estudio descrito, podría explicarse el porqué Purvis (1980) encuentra que la ubicación del fruto en el árbol es determinante en la susceptibilidad al daño por frío.

El observo que la toronja Marsh cosechada del exterior de la copa del árbol, resultó más susceptible al daño por frío a 4,4 °C. que la cosechada del interior del mismo árbol (1966). Contrariamente a lo sugerido por Harvey y Rygg (1936); Grierson (1974) y Furvis et. al (1979), ya mencionado dentro del mismo inciso, en la cáscara de los frutos del interior y exterior de la copa del árbol, no se encontraron diferencias en las cantidades de azúcares reductores, sacarosa y total de carbohidratos solubles.

Luego entonces, de acuerdo a lo anterior es lógico pensar que el fruto del exterior tuviese mayor temperatura que el del interior y por ello se expresó con mayor severidad el daño por frío en el primero.

No obstante, sería conveniente llevar a cabo un estudio similar al de Saltveit y Cabrera (1967) porque algunos de los resultados que presenta en su artículo no son congruentes.

e) Humedad relativa.

Articuladamente con todas las demás variables que se citan, la humedad relativa es de vital importancia considerarla, puesto que las cantidades de vapor de agua en la inmediata proximidad del producto hortofrutícola tiene un marcado efecto en el comportamiento fisiológico (1966). Para comprender esto se precisa de la definición del concepto.

Al vapor de agua contenido en el aire se le denomina.

humedad. La humedad absoluta del aire o densidad del vapor, es la masa de vapor de agua por unidad de volumen de aire (lb/ft³) que fundamentalmente este en funcion del punto de rocío, es decir, la temperatura a la cual el vapor de agua en el aire esta saturado. Dicho de otra manera, la humedad absoluta es igual al reciproco del valor del volumen especifico del vapor.

En la practica, el termino que se utiliza es el de humedad relativa (HR), definido como la relacion expresada en porciento de la densidad del vapor real entre la densidad del vapor a las condiciones de saturación, o bien, es la relacion entre la presión parcial real ejercida por el vapor de agua en cualquier volumen de aire y la presión parcial que ejerceria el vapor de agua contenido en el aire si estuviera saturado a la temperatura del aire, esto es: (152)

$$HR = \frac{\text{Presión parcial real}}{\text{Presión parcial de saturación}} \times 100$$

Ahora bien, los frutos y hortalizas contienen de un 80 a 90 % de agua, la cual se encuentra en los numerosos espacios intercelulares en forma de vapor, manteniendo una atmosfera saturada (HR = 99-100 %), siempre y cuando no esten bajo estres de agua (143). Tales espacios están interconectados con una gran cantidad de aperturas naturales cuyas estructuras se llaman: hidatodos (en hojas), lenticelas (en tallos, raices y

frutos, ausentes en hortalizas de hoja), estomas (con mayor numero en hortalizas de hoja que en frutos y raices) y cuticula, en donde a traves de ellas, asi como por las heridas y el pedunculo, se mueve por difusion el agua de las superficies celulares hacia el exterior, proceso conocido como transpiracion, que da por resultado la perdida fisiologica de peso.

La relacion entre la humedad y la temperatura del aire influyen en la transpiracion porque modifican el gradiente bajo el cual difunde el vapor de agua. Este gradiente conocido como "deficit de presion del vapor" (DFPV), se establece por la diferencia entre la presion del vapor en la atmosfera interna y la que rodea al producto.

De esta manera, si la humedad relativa del aire que circunda al vegetal es mas baja que la de los espacios intercelulares, se verifica un movimiento del vapor de agua hacia el exterior, siendo cada vez mayor a medida que la diferencia de las humedades relativas entre los dos medios sea mas grande. Incluso, la temperatura del producto favorece la salida del vapor por diferencias en la presion del vapor de agua.

En la tabla 12.5 se indica la relacion que guardan la presion del vapor de agua en el aire a 100 % de HR y el deficit de presion del vapor a diferentes temperaturas y humedades relativas.

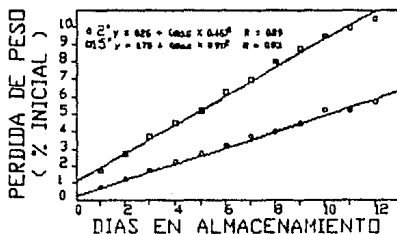
TABLA 12.6 Relacion entre el deficit de presion del vapor, la temperatura y humedad relativa.

TEMPERATURA (°C)	DEFICIT DE PRESION DEL VAPOR (mmHg)			
	100 % HR	90 % HR	80 % HR	60 % HR
0	4.579	0.4579	0.9158	1.8316
1.1	4.953	0.4953	0.9906	1.9812
2.2	5.385	0.5385	1.0770	2.1540
3.3	5.817	0.5817	1.1634	2.3268
4.4	6.299	0.6299	1.2598	2.5196
7.2	7.620	0.7620	1.5240	3.0480
10.0	9.204	0.9204	1.8408	3.6816
13.3	11.074	1.1074	2.2148	4.4196
15.6	13.248	1.3248	2.6496	5.2992
21.1	18.771	1.8771	3.7542	7.5084
25.7	24.217	2.4217	4.8434	9.6868
32.2	36.119	3.6119	7.2238	14.4476
37.8	49.098	4.9098	9.8196	19.6392

FUENTE: Frenamiento de frutas y hortalizas. Saucedo V.C. U.A.CH. (1981).

De algún modo tal relacion se ve reflejada en el comportamiento de los frutos u hortalizas durante su almacenamiento. Por lo tanto, para no incurrir en errores de apreciación deben ser tomados en cuenta, como el caso del estudio de Mc Collum (1989) al pretender observar en calabaza ' Dixie ' crecida en invernadero, la pérdida de peso que sufre durante el almacenamiento a 2 y 15 °C. El encuentra que existe una relación directamente proporcional entre ambas variables , siendo mayor la velocidad de pérdida de peso que experimenta el fruto a 15 °C que a 2 °C (74). En la grafica 17 se muestran los resultados.

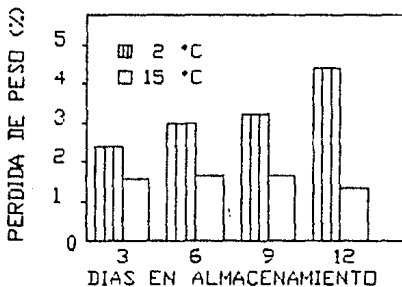
GRAFICA 17. Perdida de peso de la calabaza ' Dixie ' durante su almacenamiento a 2 y 15 °C.



FUENTE: HortScience 24(4): 633-635 (1989).

El efecto contrario sucede si las calabazas despues de 2 dias a 15 °C, se almacenan por 3, 6, 9 y 12 dias a 2 °C o 15 °C. (ver grafica 18).

GRAFICA 18. Perdida de peso de la calabaza ' Dixie ' despues de 2 dias a 15 °C seguido de un almacenamiento a 2 o 15 °C.

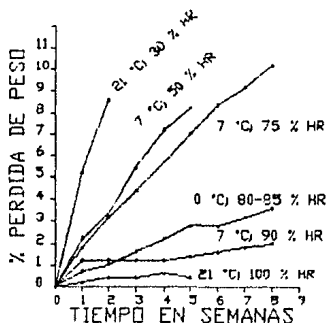


FUENTE: HortScience 24(4): 633-635 (1989).

Sin embargo, dichos resultados pueden no ser confiables ya que como se ha mencionado, la HR juega un papel importante y en el artículo no se menciona ni siquiera el dato.

En cambio, un comportamiento fidedigno de pérdida de peso del producto ante la HR, temperatura y periodo de almacenamiento es el presentado por Saucedo (1981) en manzanas c.v. Golden Delicious, como se aprecia en la gráfica 19.

GRAFICA 19. Pérdida de peso de manzanas c.v. Golden Delicious, a diversas temperaturas y humedades relativas.



FUENTE: Preenfriamiento de frutas y hortalizas. Saucedo V.C. U.A.CH. (1981).

No obstante, la velocidad del aire también puede ser causa de serias pérdidas de agua durante el almacenamiento, porosa

influye sobre el gradiente de vapor de agua próximo a la superficie del vegetal.

Normalmente existe una capa limitrofe en la superficie: una capa de aire no alterada, por medio de la cual el agua debe difundir desde la atmósfera interna a la externa. Mientras más delgada sea la capa, más acentuado es el gradiente de presión de vapor y, por consiguiente más rápida la transpiración.

El aire al perturbar la capa limitrofe, incrementa la transpiración. Empero, esto constituye por lo regular un efecto secundario. Conforme los tejidos se secan, los estomas se cierran, limitándose así la transpiración.

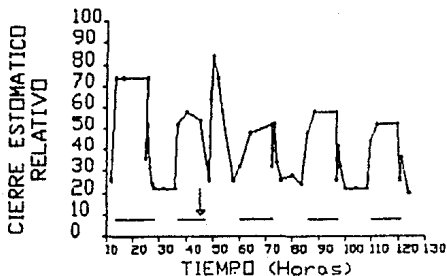
En conjunto con los factores citados, además debe contemplarse el estado del desarrollo del fruto puesto que con la maduración (ripening) se debilitan las paredes celulares y en la misma medida se incrementa la turgencia de las células oclusivas que rodean al poro (Simon, 1978). Al ocurrir tal incremento en la turgencia, los estomas se abren, permitiendo el intercambio de gases entre las células subepidérmicas y la atmósfera (Esau, 1950; Baker y Martin, 1967).

Debido a que la mayor parte de la transpiración se produce vía estomas, el grado de apertura estomática es un factor de importancia primordial para su control, ya que se ha asociado con la capacidad de las membranas que limitan el flujo de agua para aclimatarse a las temperaturas de enfriamiento.

Así lo demuestra Markhart III, observando en espinacas

sujetas a 15 °C el cierre relativo de los estomas, monitoreado continuamente con un porómetro de flujo másico. Percibe que al disminuir la temperatura de 15 a 5 °C a las 47 hrs., aun en presencia previa de una hora de luz, el estoma se cierra con el enfriamiento, debido al estrés por agua, para luego recobrar notoriamente su ciclo diurno normal en respuesta a la luz (73). La gráfica 20, lo indica.

GRAFICA 20. Cierre estomático relativo de espinacas sujetas a 15 y 5 °C.



Nota: Las líneas horizontales indican el periodo obscuro en la cámara y ↓ la disminución de la temperatura de 15 a 5 °C.

FUENTE: HortScience 21(6): 1329-1333 (1986).

El otro camino que determina las pérdidas de vapor es a través de la cutícula, pero la mayoría de los estudios muestran

que el grosor de la cutícula no tiene efecto en la resistencia a la transferencia de agua (Sitte y RENNIER, 1963; RADLER, 1965).

La tasa de respiración es mayor en hojas viejas que en jóvenes, a pesar del hecho de que las primeras tienen cutículas más gruesas. (14)

En cuanto a las lenticelas (regiones abiertas de continuo), los frutos senescentes tienden a marchitarse y arrugarse más que los frutos jóvenes con menor número de lenticelas. (14)

Faltan estudios sobre la pérdida de peso que registran los frutos y hortalizas dependiendo de su estado de desarrollo. Existe el de Vázquez y Colinas (1990) que intentan probar los cambios que experimentan las guayabas de 3 estados de madurez en respuesta a la temperatura y humedad relativa (15), pero debido a que sus resultados son poco claros, no puede llegarse a ninguna conclusión.

Los extremos de humedad ejercen un efecto que modifica la severidad del daño por frío.

La respiración de manzanas en una atmósfera seca es más lenta que aquella en manzanas en atmósferas húmedas, pero esto podría ser otro efecto físico en la porosidad de la piel, resultado de la ventilación restringida de los espacios intercelulares, como ya se explicó. (15)

Las atmósferas cerca de la saturación generan una anormal hendidura en la cáscara de manzanas y ciruelas, mientras que las

atmósferas secas producen deformidad por arrugamiento. Fidler (1968) observo que el daño por frío en manzanas ' Cox's Orange Pippin ' mantenidas a 0 °C por 4 meses fué mucho más severo en una muestra la cual tuvo pérdidas del 1-4 % en peso, que otra con más del 3 % en peso. De la misma manera un año antes, Martin et. al, experimentando con manzanas ' Jonathan ' sujetas de 0 - 6 °C encuentran una alta incidencia de descomposición de la pulpa, asociada con una baja pérdida de peso. (154). Habría que tomar en cuenta el intervalo tan grande de temperatura y que en ambos casos no se ofrecen los datos de HR, velocidad del aire, estado de desarrollo, etc.

Mientras que Mc Colloch (1962) reporta que los pimientos almacenados durante 12 días a 0 °C con HR del 88 al 90 % presentaron 57 % de cavidades, en comparación con el 33 % a HR del 96 al 98 % . con el mismo periodo de exposición y a la misma temperatura. (154)

De manera similar, Morris y Platenius (1938) obtuvieron una reducción considerable en la formación de cavidades en pepinos y pimientos, al elevar la humedad de almacenamiento al 100 %. Estos investigadores demostraron que la gravedad de las cavidades está en correlación directa con la tasa de transpiración y si los frutos no han sido expuestos a HR baja, la pérdida de agua no dará lugar a la formación de cavidades. (154)

Si bien la HR alta para algunos productos favorece la disminución de los síntomas del daño por frío, para otros resulta

contraproducente como es el caso de las manzanas. a muy elevada HR, se agrietan durante la maduración, algunas veces es referido como " deterioro a humedad elevada ". Similarmente ocurre con ciruelas. Una explicación a esto la ofrece Tomkins R.G., sugiriendo que al disminuir la adhesión celular, las células tienden a redondearse ocupando mayor espacio. Así, al cambiar la forma celular ofrecen resistencia al flujo de vapor en los espacios intercelulares, aunque no actúan como esferas discretas pero podrían aglomerarse y limitar la ventilación, especialmente si las membranas celulares se hinchan durante el ablandamiento.

Dicha explicación fue basada en algunos experimentos de Wilkinson (1965) trabajando con manzanas con humedad alta y en las cuales hubo un incremento de volumen de aproximadamente el 3 % en un periodo de 4 semanas, sin ningún correspondiente cambio de peso. (154)

Algunas investigaciones Australianas (Scott y Robert; 1968; Scott y Wills, 1976) sugirieron que el daño por frío en manzanas podría reducirse disminuyendo la HR en el almacenamiento. Esto fue atribuido a una acelerada pérdida de volátiles en especial del acetato de las manzanas y al promoverse tal dispersión de compuestos volátiles, se elimina el riesgo de un efecto tóxico en el interior de las células. (155)

Haciendo caso omiso de los estudios Australianos, en la práctica, la humedad relativa baja en el almacenamiento no es

deseable debido a la acelerada perdida de peso y al arrugamiento vinculado.

En terminos generales, para reducir las pérdidas de peso se recomienda temperaturas bajas, humedad relativa elevada y DPV pequeña.

Por supuesto al utilizar HR elevada durante el almacenamiento debe procurarse no permitir el desarrollo de microorganismos que ocasionan pudricion, debido a la condensación de humedad en la superficie de los productos. A proposito de ello, llama la atencion desde el punto de vista del efecto del enfriamiento el caso del Rhizopus stolonifer en fresas y duraznos, puesto que al inocular la lesion reciente de los frutos con 10 - 20 esporas y después de 3 a 9 hrs. transferidos a 0 °C por 5 - 7 dias, los frutos que han sido removidos de la refrigeracion, no presentan o es poca la pudrición. Mientras que aquellos frutos inoculados que no fueron refrigerados, ya están podridos. Sin embargo, se ha encontrado en cultivos, Rhizopus stolonifer resistentes, a una temperatura minima de crecimiento cerca de 0 °C en lugar de la ordinaria de 4 - 5 °C, lo cual sugiere que pudo haberse desarrollado de una generacion de hongos que sobrevivieron después de repetidas exposiciones a baja temperatura. (76)

Por otro lado, existen hongos presentes en forma latente en la capa cerosa de la piel, especificamente aislados del fruto de aguacate Colletotrichum gloeosporioides, el cual crece a la

temperatura minima " in vitro " de 6 °C, pero " in corpore vivo " puede tolerar temperaturas aun menores. Al mantener los aguacates infectados natural o artificialmente por el susodicho hongo, durante una semana a 0 °C, pudo desarrollarse en el fruto y causar pudricion cuando los frutos fueron transferidos a temperatura ambiente. (70)

De la misma manera sucede con el hongo, Phytophthora citrophthora, principal causante de la pudricion obscura en citricos. " In vitro " no pudo reproducirse por abajo de los 5 °C, pero despues de haber sometido a los frutos por espacio de 3 - 4 semanas a 0 °C y ser transferidos a temperatura ambiente, el hongo pudo todavia reproducirse, causando pudricion. (70). Lo mismo sucede con el Gloeosporium musarum en platanos mantenidos a 20 °C despues de haber sido expuestos a 6 ± 0.5 °C de 9 - 15 dias y con Rhizopus nigricans, el cual causa una pudricion suave en camotes almacenados a 20 °C, despues de estar sujetos de 0 - 8 °C por 3 semanas. (21, 24)

Estos hongos tolerantes al frio que se les ha permitido producir y desarrollar esporas, estas han exhibido una sensibilidad al frio similar a aquellas esporas de la primera generacion.

Si bien es cierto, que las esporas germinando pueden ser estimuladas por una no-lethal exposicion al frio, tratamientos frecuentemente utilizados para esporas sexuales.

Y por otro lado, se sabe que las esporas sexuales son

extremadamente resistentes a la congelación, desecación y a otras condiciones del medio desfavorables y pueden ser capaces de vivir por meses o años antes de la germinación. Además algunas veces germinan si son sujetas por semanas o meses alternando congelación y descongelación.

Fues bien, no hay necesidad de preocuparse por la resistencia de los estados sexuales de hongos patógenos poscosecha, ya que estos no se encuentran comúnmente en frutos u hortalizas infectados después de cosechados. El interés se centra en las esporas vegetativas o en micelios jóvenes. (70.144)

f) Prácticas culturales.

Por años, se han realizado muchos intentos para correlacionar el comportamiento de los productos vegetales en el almacenamiento a bajas temperaturas con las prácticas culturales.

Llegan a llamar la atención aspectos como: el rizoma, edad y espaciamento de las plantas, el tipo de suelo, el manejo de la tierra, además de la poda, riego, fertilización y tratamientos para impedir el desarrollo de microorganismos, entre otros; aunque los experimentos generalmente no muestran evidencias claras en el mecanismo del daño por frío.

Algunos de los estudios se centran en la composición mineral sobre todo de frutos de gran importancia comercial como es el caso de las manzanas. (154)

Una revisión amplia para manzanas, considerando la nutrición

y su efecto en la calidad ha sido la realizada por Bonemann (1964). Sin embargo, existen gran numero de recortes contradictorios, quizas debido a que el mismo fruto no necesariamente tiene que reaccionar de la misma manera en las diferentes partes del mundo, puesto que influyen innumerables condicionantes.

En general, puede decirse que la aplicacion del mayor nutriente, el nitrogeno, tiene poco efecto en los desordenes fisiológicos de manzanas y que cuando se observa algun efecto es atribuido al incremento del crecimiento y del tamaño del fruto.

Segun Morton y Watson (1948) y Njoku (1957), la baja temperatura en plantas de papa fertilizadas en exceso con nitrogeno producen vestagos grandes verde-oscuros pero de raices escasas y tuberculos muy pequeños....

En cuanto al potasio se ha mostrado que en ciertas circunstancias, la aplicacion extra en forma de hidruido de potasio puede reducir la severidad del daño por frío (Montgomery y Wilkinson, 1962), pero frecuentemente se encuentra que agrava el hoyo severo (bitter pit) en manzanas....

El bitter pit se presenta como pequeñas áreas secas color café, de unos pocos milímetros de diametro, localizados ordinariamente en la pulpa mas externa de la manzana justo abajo de la cáscara y solo se observan hasta cuando el fruto es pelado o cortado. En casos severos, los pits pueden verse en la manzana como depresiones oscuras en la cáscara. En algunos casos

el disturbio se limita a uno o dos ' pits ', aunque tambien puede motearse todo el fruto. Una examinacion microscopica muestra que las células anormales estan colapsadas y muertas, con paredes diferentes a las del tejido sano, y a pesar de su apariencia no están suberosas (como el corcho). Las células colapsadas contienen granos de almidón mismos que desaparecen durante el almacenamiento. (154)

En cuanto al calcio, se ha observado que su deficiencia causa: puntas quemadas en lechuga, centro obscuro de la papa, picadura profunda en manzanas, etc.

No obstante, Apeland (1966) probando con pepinos crecidos en invernadero. un experimento de fertilizacion factorial (4 Ca x 4 K x 2 N) no revelo ningún efecto significativo. (5)

g) Luz.

La luz contribuye en el desarrollo de los síntomas del daño por frio, puesto que está relacionado con la fotosíntesis.

La fotosíntesis en especies sensibles al enfriamiento es marcadamente reducida por la temperatura baja y se acentúa en presencia de luz (Martin, Ort y Boyer, 1981), por ejemplo: si los tejidos de las hojas son enfriados en la obscuridad no ocurre gran inhibición de fotosíntesis (Powels, Berry y Bjorkman, 1983), ni blanqueamiento de clorofila (Bagnall, 1979).

Tambien, el estres por agua inducido por el enfriamiento, exagera la disminucion en fotosíntesis y en consecuencia influye

en la oclusión estomatal (Crookston, O'toole, Lee, Osbun y Wallace, 1974) ya referida.

Se ha reportado que en el cloroplasto sucede el daño directo, pero la precisa localización de este no es entendido. En evidencias recientes por parte de Smillie y Nott (1979), Smillie y Hetherington (1983) y Potvin (1985) sugieren estar en el sitio oxidativo del fotosistema II, sin embargo aun falta más investigación al respecto así como del efecto del enfriamiento en fotorespiración.

13. TECNICAS PARA AMINORAR O EVITAR EL DAÑO POR FRIO.

Posiblemente el aspecto relevante al estudiar los daños por frío sea el desarrollar métodos para aminorar o evitarlos.

Tomando como fundamento los resultados de las investigaciones sobre el efecto de la baja temperatura en la actividad metabólica de los productos hortofrutícolas, se han propuesto procedimientos que de alguna manera tienden a contrarrestar tal efecto. Entre ellos podrían citarse los siguientes:

I. Hardening

- a) preacondicionamiento
- b) temperaturas intermitentes

II. Tratamiento químico

III. Control hormonal

IV. Almacenamiento en atmósferas controladas

V. Almacenamiento en atmósferas modificadas

VI. Almacenamiento hipobarico

I. Hardening.

La traducción literal al español del término hardening no proporciona una idea clara del significado real, de manera que se adopta como tal.

Comúnmente se refiere al proceso que provee resistencia o tolerancia al enfriamiento a las especies sensibles.

No obstante, además de poderse inducir por temperaturas bajas (Wheaton y Morris, 1967; Wilson, 1976; Wilson y Crawford, 1974), se provoca por subresión de agua, lo cual equivale a humedades relativas bajas, normalmente conocido como " hardening seco " (Wilson, 1976) o bien, por la aplicación de soluciones salinas concentradas durante el crecimiento de las plantas (Rikin, 1976). Aunque no todas las especies responden a dichos tratamientos (Wilson y Crawford, 1974; Wilson, 1976; Wilson, 1978).

Los productos que han sido acondicionados por esta forma son más resistentes al subsecuente enfriamiento que aquellos que fueron transferidos directamente a temperaturas bajas (Wheaton y Morris, 1967).

A pesar de la enorme cantidad de investigaciones, el hardening sigue siendo un " fenómeno oscuro ".

En el punto 12 se ha mencionado como las condiciones del medio influyen en la incidencia del daño por frío, específicamente las variaciones estacionales provocan cambios bioquímicos y fisiológicos en los tejidos de los frutos u hortalizas como respuesta a las temperaturas dañinas. Dichos cambios son asociados con el hardening.

Los productos expuestos al hardening exhiben un incremento en los ácidos grasos insaturados, ATP, actividad de ATPasa y disminución del fotoperíodo, en donde tanto las temperaturas de día como de noche dan por resultado una disminución del almidón y

un incremento en carbohidratos (en mayor proporción sacarosa que glucosa o fructosa). Similarmente, aumentan los niveles de prolina, poliaminas y de los ácidos abscísico (ABA), glutámico y ascórbico, entre otros.

A continuación se indican algunos estudios que lo demuestran.

Durante el hardening por temperaturas bajas en plantas sensibles, el grado de insaturación de los ácidos grasos ha sido relacionado con el incremento en la fracción de fosfolípidos y no en la de glicolípidos (Wilson y Crawford, 1974). También se ha demostrado que tanto el grado de insaturación como el contenido de fosfolípidos, disminuye conforme el producto se va acercando a la senescencia. En este renglón, habría que recordar que la teoría de la fluidez de membrana esta basada precisamente en el hecho de que las membranas de especies resistentes al enfriamiento son más ricas en ácidos grasos insaturados.

Así pues, contrariamente a lo esperado Wilson (1976) al comparar dos métodos de hardening, encuentra que el hardening seco de plantas de frijol por 4 días a 25 °C y 40 % HR fue tan efectivo como el de por baja temperatura con 4 días a 12 °C y 85 % HR en la prevención del daño por frío, aunque en el primero no hay incremento en el grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos, sugiriendo que la composición de lípidos no está directamente involucrada en el desorden fisiológico o que el hardening seco induce de alguna otra manera

la protección contra el daño por frío. (136)

Seis años más tarde, Nordby y Yelenosky confirman que con el hardening frío, las cantidades absolutas de triacilglicéridos y fosfolípidos, aumentan. De los ácidos grasos insaturados, el linoleico fue el que más incrementó en un 141% en cidra (Citrus medica L.), 210% en limón áspero (Citrus limon Burm F.) y 233% en naranja agria (Citrus aurantium L.). Los incrementos específicos del ácido linoleico fueron hallados en triacilglicéridos, en 4 fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol) y en lípidos neutros. (137)

Como se ha señalado no tan solo el incremento en ácidos grasos insaturados en la fracción fosfolípídica está involucrado con el hardening por baja temperatura. Su aprovechamiento evita la disminución de ATP que ocurre ordinariamente durante el enfriamiento (Stewart y Guinn, 1969, Wilson, 1978). (138)

Por otra parte, en su estudio citoquímico de la actividad de la ATPasa asociada con varios organelos, en células de retoños de trigo (Triticum aestivum L. cv. Nongke No. 1) llevados a cabo por observación en microscopía electrónica, Liang-Cheng Jian, Long-Hua Sun y He-Zhu Dong (1982), encuentran que fue alterada durante el hardening frío, mostrando en sus resultados que:

a) A 22 °C se observó elevada actividad de ATPasa en el plasmalema de tejidos con y sin hardening.

A 5 °C notaron gran actividad de ATPasa en el plasmalema

de tejidos con hardening.

b) Las vacuolas y tonoplastos exhibieron gran actividad de ATPasa a 22 y 5 °C en tejidos con hardening, lo contrario sucedió en tejidos no acondicionados.

c) A 5 °C la actividad de la ATPasa disminuyó en el nucleolo y cromatina de tejidos con hardening, opuestamente a los tejidos no tratados.

Estos los conduce a proponer que los cambios adaptativos de la actividad de la ATPasa están asociados con un particular organelo o membrana, lo que a su vez podría relacionarse con el desarrollo de la resistencia a temperaturas bajas.

En lo que se refiere al nivel de carbohidratos, Crawford y Huxter (1977) encontraron que el mantenimiento de un adecuado suministro de azúcar en raíces está asociado con la diferente habilidad del maíz y chicharo para crecer a temperaturas bajas.

Los altos niveles de azúcares reductores, según Purvis, Kawada y Grierson (1979), en la cáscara de toronja están absolutamente relacionados con la resistencia al daño por frío. (134)

Sin embargo, la acumulación de sustancias reductoras (principalmente azúcares) sugieren Young (1975) y Yelenosky (1975), es una respuesta a la temperatura de enfriamiento más que un criterio para determinar la relativa tolerancia al frío. (134)

Una relación similar se encontró entre el nivel de prolina y

la resistencia al enfriamiento. Furvis (1981) reporto que los niveles de este aminoacido fueron mas elevados en las cáscaras de toronjas cuando las temperaturas nocturnas estacionales alcanzaron su minimo y mas bajos cuando las temperaturas nocturnas se incrementaron en la primavera. La mayor resistencia de las toronjas al daño por frio, durante su almacenamiento a bajas temperaturas, coincidió con las concentraciones mas altas de prolina. El mismo investigador un año antes, demuestra que las toronjas cosechadas del exterior de la copa del arbol (canopy) con bajo nivel de prolina, resultaron ser las mas sensibles al desorden fisiológico comparadas con las cosechadas del interior. Lo cual puede ser una parte esencial del mecanismo del hardening.

Kushay y Yelenosky (1987) informan que los cítricos respondieron al hardening con un incremento substancial uniforme en prolina y espermidina y un poco menos en putrescina y espermina. El porqué todavia no se sabe. (25)

Para lograr el hardening específico para cada especie-variedad, debe buscarse la adecuada interrelación de los factores citados en el punto 12, puesto que se ha observado que en algunos productos sujetos a temperaturas bajas y 100 % HR, se impide la pérdida de agua, por lo tanto el marchitamiento y algunos otros síntomas del daño por frio no se presentan cuando son transferidos a temperaturas mas elevadas (Wright y Simon, 1973). La fuga de electrolitos al colocarlos en un medio

hipotónico resulta menor en los enfriados al 100 % HR que aquellos con 85 % HR. (ver punto 5.2)

En cambio, Wilson (1976) menciona que los frutos u hortalizas en los que no se llevó a cabo el hardening, no son protegidos contra el daño por frío aún y con el 100 % HR durante el enfriamiento. Además noto que las plantas de frijol a 12 °C por 4 días, una temperatura normal de hardening, pero con 100 % HR, son dañadas en la misma forma que las plantas no acondicionadas y que fueron expuestas al enfriamiento. (139)

Por los mismos hechos, parece que la pérdida de agua previa al enfriamiento podría ser benéfico para el hardening, mientras que todo lo contrario si se da durante el enfriamiento y en consecuencia se expresan los síntomas del daño por frío.

Luego entonces, el hardening puede lograrse por medio de:

- a) Preacondicionamiento y
- b) Temperaturas intermitentes.

a) Preacondicionamiento.

Un acondicionamiento de los frutos u hortalizas previo al enfriamiento reduce la incidencia del daño por frío.

Las plantas y sus productos acondicionados por la exposición a temperaturas ligeramente superiores al intervalo de enfriamiento crítico fueron más resistentes al subsecuente almacenamiento a bajas temperaturas, según Harding, Soule y Sunday, 1957; Mc Colloch, 1962 y Wheaton y Morris, 1967. (134)

Los tomates mantenidos a 12.5 °C por 3 o más horas resultaron más resistentes al enfriamiento a 1 °C, que los que no fueron preacondicionados (Wheaton y Morris, 1967).(134)

También Mc Colloch (1962), observó que la exposición de pimiento morrón por 5 o 10 días a 10 °C, aminora el daño por frío a 0 °C.(134)

Una exposición de toronjas por 7 días a 10 o 15 °C aminoran o evitan significativamente el desorden fisiológico, durante el almacenamiento a 0 o 1 °C (Harding et. al, 1957; Hatton y Cubbedge, 1980).(134)

En estudios más recientes, Hatton y Cubbedge (1982) encontraron que el daño por frío en las toronjas puede ser aminorado durante el almacenamiento a 1 °C por 21 días bajo condiciones de alta humedad relativa (88 al 92 %), cuando los frutos son preacondicionados a 16 °C por 7 días. Los mismos investigadores un año después, intentan probar que elevando la temperatura del preacondicionamiento puede reducirse aun más la incidencia del daño por frío, pero resulta contrario a lo esperado.(44)

Sin embargo, en otras especies, un acondicionamiento previo al almacenamiento frío con temperaturas altas, ha sido favorable en la disminución del daño por frío, tal como lo demuestran: Hirose (1985) y Nakamura et. al (1985) en pepino; Abe y Chachin (1985) y Nakamura et. al (1985) en berenjena; Spalding y Reeder (1983) en lima, Chen y Paul (1986) en

papaya: Mc Colloch (1962) y Thompson (1979) en pimiento; Fitch (1987) en camote; Fitch (1986) en sandía y Mc Donald (1986, 1989) en limones. En todos los casos utilizando humedades relativas entre el 80 y 92 %.

Mc Donald (1986) observa que el acondicionamiento de los limones por 3 días a 21 °C previo al almacenamiento a 1 °C, reduce el daño por frío.

Debe hacerse hincapié que no pueden establecerse condiciones únicas para cada especie hasta no haber contemplado todos los factores que citan en el punto 12. ya que si se quisiera probar con alguna de las condiciones mencionadas para la misma especie, en otro periodo de cosecha o inclusive en el mismo que las obtuvieron pero un año después, es probable que no coincidan.

b) Temperaturas intermitentes.

Antes de que el daño irreversible tome lugar, es conveniente un tratamiento con temperaturas intermitentes. Este consiste en la interrupción continua del almacenamiento frío por uno o mas períodos breves de recalentamiento.

Sin embargo, si el tratamiento de recalentamiento es muy frecuente o por períodos indebidos, los tejidos de los frutos u hortalizas pueden llegar a ser excesivamente blandos y vulnerables a la pudrición. Por lo tanto, el control del tiempo en el que debe interrumpirse el almacenamiento refrigerado así como la duración del tratamiento de recalentamiento son críticos.

El incremento en la vida de almacenamiento y la resistencia al enfriamiento por temperaturas intermitentes ha sido reportado en manzanas por Kidd y West (1935), Smith (1959); en cítricos, Brooks y Mc Colloch (1936) y Davis y Hofmann (1973); en arándanos, Hruschka (1970); en pepinos, Wang y Baker (1979); en nectarinas, Anderson y Hardenburg (1977) y Wang y Anderson (1981); en duraznos, Anderson y Penney (1975), Ben-Arie, Lavee y Guelfat-Reich (1970), Buescher y Furmanski (1978) y Wang y Anderson (1981); en ciruela, Smith (1947); en papas, Hruschka, Smith y Baker (1969); en pimiento morrón, Wang y Baker (1979); y en tomates, Marcellin y Eccaunaud (1979).

De los estudios más recientes el que sobresale es el de Cohen, Shueh y Shalom (1983) en donde utilizando temperaturas intermitentes de 7 días a 13 °C seguidos de 21 días a 2 °C, evitaron el daño por frío en limones Eureka y Villa franca, pudiendo ser almacenados por 6 meses e inclusive 2 años reteniendo su calidad comercial.

El mecanismo podría sustentarse en que los periodos de calentamiento permiten a los tejidos metabolizar las sustancias tóxicas que son acumuladas durante el enfriamiento o bien restablecer materiales que fueron agotados durante el enfriamiento (Lyons, 1973).

Existen evidencias de que el daño en la estructura de organelos de plantas enfriadas, puede ser restaurado por el recalentamiento (Moline, 1970; Niki, Yoshida y Sakai, 1979).

El restablecimiento del retículo endoplasmico fue observado por Niki et. al (1979) en cultivos de células de Cornus stolonifera después del enfriamiento a 0 °C. La recuperación de los cambios estructurales en mitocondria y plástidos fue evidenciado por Moline (1976) en células de tomates enfriados después del recalentamiento a 18 °C. La restauración del ATP depauperado lo observaron Stewart y Guinn (1969) por el recalentamiento de brotes de algodón después de 24 hrs. a 5 °C, así como su recuperación de la capacidad para la eficiencia de fosforilación oxidativa y la inversión en la salida de iones inducidas por el enfriamiento demostradas por Creencia y Bramlage (1971).

Buescher y Furmanski (1978) reportan que el tratamiento con temperaturas intermitentes en duraznos sirve para conservar niveles adecuados de enzimas pectolíticas: pectinesterasa y poligalacturonasa y reduce la vellosidad durante la maduración después del almacenamiento a bajas temperaturas.

También resulta para impedir la acumulación de ácido clorogénico y la disminución de ácido ascórbico debida a la baja temperatura en camotes Porto Rico (Lieberman, Craft y Wilcox, 1959).

Wang y Baker (1979) y Anderson y Wang (1981) proponen que el paso del enfriamiento al calentamiento provoca un incremento en la insaturación de los ácidos grasos, en tanto del calentamiento al enfriamiento una desaturación de los ácidos

grasos, en base a que las temperaturas intermitentes incrementaron la insaturación de ácidos grasos de lípidos polares en duraznos, pepinos y pimiento morrón, aminorando la descomposición inducida por el enfriamiento. El cambio de temperaturas posiblemente induce un reajuste rápido del metabolismo.

Durante el periodo de calentamiento de los tejidos de duraznos y pepinos, aumentaron las cantidades de $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$ mientras que en el enfriamiento las de $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$.

Parece ser que el incremento en las cantidades del ácido esteárico podrían servir como sustrato para la desaturación de ácidos grasos durante el subsiguiente enfriamiento, así el calentamiento intermitente durante el almacenamiento frío podría dar por resultado la acumulación de ácidos grasos con mayor insaturación.

Por el mismo estilo, Rivera y Penner (1978) habían informado que en tejidos de soya, los ácidos palmítico y esteárico aumentaron, pero el oleico, linoleico y linolénico disminuyeron en las membranas, celular y mitocondrial al elevar la temperatura, mientras que la tendencia contraria ocurrió con el descenso de la temperatura.

II. Tratamiento químico.

Los tratamientos químicos aplicados están basados en circunspección de las modificaciones químicas que proporcionan

resistencia a los productos hortofrutícolas, cuando son sujetos a bajas temperaturas. Principalmente se han enfocado a los cambios que experimentan los lípidos de las especies sensibles al enfriamiento.

Dentro de estos destacan:

- 4-cloro-5-(dimetilamino)-2-fenil-3(2H)-piridazinona. Una piridazinona análoga a la encontrada por Hilton et. al (1971) para inhibir la producción de ácido linolénico.

Su aplicación ha demostrado incrementar la relación ácido linoleico/ácido linolénico en lípidos polares, guiando a una disminución de la resistencia al enfriamiento de raíces de plantas de algodón (St John y Christiansen, 1976).

Similares resultados encuentra Willemot (1977) al probar con BASF 10-008, un derivado de piridazinona, en raíces de trigo invernal. (131, 134)

- Etanolamina. Esta induce la alteración en la composición de fosfolípidos por el incremento relativo de las cadenas acil C:18 en fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina a expensas del C16:0, en membranas de tomate, atenuando el daño por frío (Waring, Breidenbach y Lyons, 1976).

Además, Ilker et. al (1976) indican que durante la examinación de los tejidos de cotiledones de tomate tratados con etanolamina, mantienen la turgencia y forma celular, no percibiéndose desorden fisiológico en pared celular, citoplasma y mitocondria. (134)

- Radicales libres. Son compuestos químicos altamente reactivos involucrados en el ataque peroxidativo, que dá lugar a la descomposición de las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados de lípidos polares contenidos en las membranas, cuando estas son bañadas por abundante oxígeno.

Dicho proceso puede ser inhibido por la salida de tales radicales libres. Así, eliminados, se retarda la pérdida de ácidos insaturados y en consecuencia disminuye la severidad del daño por frío. (134)

Wang y Baker (1979) muestran que la aplicación, previa al enfriamiento, de benzoato de sodio 10 mM y etoxiquina (6-etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina) 9.2 mM, actúan como radicales libres que pueden liberarse, manteniendo un lativo grado de insaturación elevado de ácidos grasos C18 en lípidos polares y de esta forma aminoran el daño por frío en pepinos y pimientos morrones almacenados a 2.5 °C por 5 o 7 días y luego transferidos a 20 °C. El mecanismo directo por el cual lo logran no ha sido demostrado. (135)

La etoxiquina es reconocida como antioxidante (Slater, 1972) e inhibidor efectivo del escalde o quemadura superficial de manzanas (Smock, 1957). El escalde se cree que es una forma de daño por frío, causado por la acumulación de sustancias tóxicas tales como acetaldehído, α -farneseno, hidroperóxido trieno u otros compuestos orgánicos volátiles, durante el almacenamiento refrigerado (Huelin y Coggiola, 1970; Willis,

Scott y Mc Glasson, 1970; Willis, 1977). (13, 134, 134)

- Benomil (metil 1-(butilcarbomol)-2-benzimidazol-carbamato) y Tiabendazol, TBZ (2-(4-tiazolil)-benzimidazol). Estos compuestos efectivos como fungicidas, reducen la incidencia del daño por frío, cuando son aplicados conjuntamente con el encerado y empaque.

Chalutz et. al (1985) informan que el TBZ (0.4 %) en el revestimiento ceroso de toronjas ' Marsh ' redujo por mas del 50 % los sintomas por frío (12). De igual manera fue demostrado en la misma especie por Schiffmann-Nadel et. al (1972). Kokkalos (1974), Wardowski et. al (1975) y Morris (1982). (134)

Llegan a similares conclusiones Wild y Hord (1989) utilizando naranjas ' Valencia ' como material de experimentación al ser almacenadas 15 semanas a 1 °C. Solo que ellos llevaron a cabo un proceso que podría considerarse equivalente a un " curado ", puesto que sumergieron los frutos en suspensiones de benomil (500 mg.lt⁻¹) o TBZ (1000 mg.lt⁻¹) 2 minutos a 53 °C. El tratamiento con TBZ caliente, resulto mejor que con benomil. (137)

Las aplicaciones de benomil en duraznos y nectarinas, retuvieron una acidez mas alta y sufrieron menos descomposición interna despues de un periodo prolongado a bajas temperaturas, que los controles (Wang y Anderson, 1981). (134)

La razón por la cual disminuyen los daños por frío con estos tratamientos podría ser que al inactivar las infecciones latentes de hongos, no se debilitan las paredes celulares que generalmente predisponen a los frutos al daño cuando son sujetos a estrés por enfriamiento. (137)

- Calcio. Debido a que la deficiencia de éste ión causa: disminución en la rigidez de la pared celular, incremento en la microviscosidad de membranas, alteración en la permeabilidad de membrana, pérdida de compartimentación (Poovaiah, 1986), además de retardar el comienzo de la maduración " ripening " (Tingwa y Young, 1974). Se ha asociado los niveles bajos, con los frutos más sensibles al enfriamiento. Dadas estas razones muchos estudios están encaminados al aporte de Calcio endógeno.

Así, Chaplin y Scott (1980) demuestran que la infiltración al vacío de soluciones de CaCl_2 en el intervalo de 1 a 7.5 % peso/volumen, reducen significativamente el oscurecimiento, inducido por el enfriamiento, del mesocarpio de aguacates mantenidos a 5 °C por 3 semanas.

Kader y Morris (1975) no observaron disminución de síntomas de la alteración fisiológica por frío en tomates sumergidos o por infiltración de CaCl_2 al 1 %. Sin embargo, Moline (1980) probó que sí se reducen tales síntomas, pero solo utilizando una mayor concentración de CaCl_2 .

- Estabilizadores de membrana y alcoholes polihídricos. Tajima y Shimizu (1977) reportan que estas sustancias

aminoraron el daño por frío en brotes de sorgo, proponiendo que los estabilizadores impiden el incremento en la permeabilidad de membrana controlando su fluidez, mientras que los homólogos del glicerol inhiben la desnaturalización de las proteínas a bajas temperaturas (134).

- Antitranspirantes. Estas sustancias no reducen el daño por frío en toronjas (Wardowski et. al, 1975) pero previenen el marchitamiento provocado por el enfriamiento en plantas de algodón (Christiansen y Ashworth, 1978). El efecto de los antitranspirantes podría asociarse con la protección de la resecaación foliar y con el mantenimiento del nivel de agua en el órgano. (134).

- Dimetilpolisiloxano, aceite de cántamo y aceite mineral. Estos previenen el oscurecimiento de la cascara de plátanos, inducido por la baja temperatura. Jones, Freebairn y Mc Donald (1978) atribuyen la efectividad de dichos aceites naturales a sus altos contenidos de ácidos grasos insaturados así como a sus cambios limitados en viscosidad con el cambio de temperatura.

III. Control hormonal.

Las hormonas son compuestos sintetizados en un lugar del organismo y transportados a otro, donde actúan regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo de forma específica. Generalmente el efecto de las hormonas es indirecto y son activas en pequenísimas concentraciones; por lo tanto, el efecto de los

metabolitos, nutrientes y compuestos analogos, ya sea directa o indirectamente, sobre el metabolismo como inductores o correpresores, no constituye una accion hormonal...45.

En realidad es muy dificil definir el término hormona vegetal, a menudo se prefiere en su lugar, el de fitoregulador (definido en el punto 6.1) y más recientemente el de regulador de crecimiento.

Se conocen varias clases de reguladores de crecimiento, algunas son promotores y otros inhibidores, entre ellos se cuentan: las auxinas como el ácido indolacético (IAA), giberelinas, citocininas, ácido abscísico (ABA), el etileno (C_2H_4).

Bueno pues, en base a la observacion de que la variacion estacional influye en la resistencia de toronjas al daño por frío, Grierson (1974), Ismail y Grierson (1977) y Kawada, Wheaton, Purvis y Grierson (1979) proponen que la susceptibilidad al enfriamiento, posiblemente esta relacionada con las condiciones de crecimiento general del árbol, desbalance en los reguladores de crecimiento, asi como las modificaciones inducidas por el estres al medio.

Para esto, Ismail y Grierson (1977) asociaron el incremento de la resistencia poscosecha al enfriamiento de las toronjas, con la aplicacion de benziladenina, ácido 2.4 diclorofenoxiacético y ácido giberélico. Kawada et. al (1979) no pudieron correlacionar positivamente los niveles endógenos de

IAA con la resistencia al frío. No obstante, Tajima y Shimizu (1977) al observar que el tratamiento con la auxina disminuye significativamente el marchitamiento inducido por el enfriamiento de las hojas de sorgo, proponen que el IAA podría incrementar el contenido de 3'-5'-AMP cíclico para mantener la estabilidad de membrana, disminuyendo por ende su deterioro a baja temperatura.

Wang, Neillethin y Hansen (1971) estudiando el efecto del enfriamiento en la maduración prematura de peras Bartlett, observan que puede ser contrarrestado con la aplicación de ácido giberélico.

Existen algunas otras evidencias que indican que el sistema hormonal de las plantas está involucrado en la regulación de la respuesta a temperaturas subcero, como por ejemplo, el aumento y disminución respectiva, de los ácidos abscísico y giberélico en la resistencia al frío de plantas de alfalfa (Irving y Lanphear, 1968; Rikin et. al, 1975).

El nivel endógeno de ABA puede incrementarse con tratamientos que provoquen estrés ya sea por agua, nutrientes, sal, enfriamiento o por la aplicación exógena (Rikin et. al, 1976, 1979).

Los pretratamientos con ABA incrementan la tolerancia al subsecuente enfriamiento y previenen la despolimerización de microtubulos en plantas de algodón, así como también en cotiledones de pepinos, se elimina la fuga de electrolitos (Rikin et. al, 1975, 1976, 1979, 1981). (104, 105)

Kawada et. al (1979) encuentran que la resistencia al daño por frío de las toronjas cosechadas fué positivamente correlacionada con los niveles de ácido abscísico, logrados por la inmersión en 50 ppm. (13).

Evaluando el efecto protector del ABA durante el enfriamiento, Markhart III (1984) señala que este ácido disminuye el estrés por agua causado por el aumento de la resistencia de la raíz para el flujo de agua, a su vez inducida por la temperatura baja. (23).

Anteriormente se pensaba que debido al ABA disminuía la transpiración, sin embargo después se evidencio que no afecta al cierre estomático. (23).

Se ha demostrado que el ABA contribuye en el balance del agua (Jones y Mansfield, 1970; Glinka, 1970; Tal e Imber, 1971; Mizrahi et. al, 1974), altera la síntesis de proteínas en plantas estresadas por sal (Eressan y colaboradores, 1986) e influye en las propiedades hidráulicas de la raíz (Markhart III et. al, 1979, 1984).

La forma en la que ejerce su efecto, sugiere que debido a su geometría molecular podría enlazarse muy bien en la cola de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana, de manera similar a la intercalación de los esteroides dentro de la bicapa lipídica, alterando así el metabolismo asociado con la modificación de la estructura de membrana. (23).

En cuanto al etileno se ha observado que difiere su efecto

en la respuesta de los frutos u hortalizas al enfriamiento dependiendo de otros factores, como el estado de desarrollo o el tiempo en el que se aplica. Por ejemplo, la exposición de los melones Honey Dew a 1000 ppm de C_2H_4 por 24 horas a 20 °C antes del almacenamiento a 2.5 °C por 2.5 semanas, reduce la incidencia del daño por frío en no menos del 75 % (Lipton y Aharoni, 1979). De la misma manera encuentra Grierson (1974) que el desverdecimiento con etileno previo al almacenamiento refrigerado, disminuye la alteración fisiológica en toronjas.

Sin embargo, en tomates verde-maduros así como en toronjas totalmente coloreadas, el tratamiento con etileno antes de almacenamiento a temperatura baja, no reduce los síntomas de enfriamiento (Grierson, 1974; Ogura et. al, 1975).

La aplicación del etileno en camotes enfriados no elimina la incidencia del centro duro, pero si la disminuye (Buescher, 1977).

Tal parece que un simple regulador de crecimiento pueda inducir varias respuestas en función del producto, si su aplicación se realiza en la pre o pos-cosecha o en el pre o post-enfriamiento. Wang (1982) opina que quizás se deba a que entre los reguladores de crecimiento y la susceptibilidad al enfriamiento no existe una relación directa de causa-efecto, e indirectamente actúan los primeros afectando otros procesos metabólicos que si guardan una relación más estrecha con la susceptibilidad al daño por frío.

El balance de los reguladores de crecimiento es otro factor que influye.

La gama en la interrelación de factores que participan en el metabolismo es muy amplia y resulta difícil soslayar alguno de ellos, máxime si su participación no es directa, puesto que todos actúan en su conjunto de manera muy específica bajo ciertas condiciones. Un buen ejemplo y por demás interesante es el caso del fitocromo, un regulador del crecimiento que muchas de sus actividades parecen asociarse con cambios súbitos e importantes en la permeabilidad de membranas.

Se piensa que el fitocromo puede afectar la actividad de las enzimas ligadas a la membrana (incluyendo ATPasas transportadoras de iones) o de otras moléculas reguladoras (particularmente ácido giberélico).

Por éstas razones, a este compuesto que circula por toda la planta haciendo las veces de sensor del color (inclusive es capaz de percibir cambios muy pequeños en la longitud de onda de la luz recibida), se le atribuye la responsabilidad de poder cosechar tomates más grandes o papas y pimientos mejor desarrollados.

A ello demuestran los investigadores de la Universidad Clemson, en Clemson, Carolina del Sur, así como los del Centro de Investigaciones sobre Llanuras Costeras, del Departamento de Agricultura del Gobierno de Estados Unidos, en Florence, Carolina del Sur, al experimentar con el cultivo de hortalizas utilizando

diferentes colores de cubiertas protectoras. En el caso del tomate, con elástico rojo aumento el rendimiento de frutos de alta calidad en un 20 % en 1986 y 10 % en 1987, en comparación con las plantas protegidas con plástico negro. Las papas y otras hortalizas de raíz parecen preferir la luz blanca reflejada.

Todo esto conduce a pensar que la actividad del fitocromo pudiese depender en parte, del clima de la región en que crecen los frutos, pero faltaría investigar que sucede cuando también la temperatura baja, toma lugar.

IV. Almacenamiento en atmósferas controladas.

Técnicamente la atmósfera controlada (AC) implica la adición o sustracción de gases dando como resultado una composición atmosférica bastante diferente a la del aire normal. Así el CO_2 , O_2 , CO , C_2H_4 , acetileno o N_2 pueden ser manejados para obtener diversas combinaciones de gases. Sin embargo, en la práctica el término se emplea para indicar un incremento en CO_2 , disminución en O_2 y altos niveles de N_2 , en comparación con la atmósfera normal. (14)

Muchos resultados reportados con respecto a la efectividad de las atmósferas controladas en la reducción del daño por frío, han sido contradictorios, posiblemente debido a que no fué acertada la interrelación entre las concentraciones de O_2 y CO_2 , la duración del tratamiento, la temperatura de almacenamiento y en algunos casos las fechas de cosecha.

Algunas de las condiciones experimentales mediante las cuales se logró evitar el daño por frío, se muestran en la tabla 13.1.

TABLA 13.1 Condiciones experimentales en AC para evitar el daño por frío en frutos u hortalizas.

FRUTO U HORTALIZA	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	TEMPERATURA (°C)	ALMACENAMIENTO (DIAS)	FUENTE
Aguacates 'Fuerte'	4-5	4-5	7.2	30	Overholser (1928)
Aguacates 'Fuerte'	3-5	3-5	5-6.7	60-90	Biale (1942,1947); Hodgson (1951); Hatton y Feeder (1965)
Aguacates 'Fuerte'	2.9	2.1	10.0	60	Hatton y Feeder (1965)
Aguacates 'Lula'	2.0	2	7.2	40	Feeder y Hatton (1971)
Aguacates 'Fuchs' 'Waldin'	10	2	7.0	20-30	Scott y Chaslin (1978)
Chicharos	5-7	5-10	0	20	Tomkins (1957)
Mangos 'Keitt'	5	5	12.8	20	Hatton y Feeder (1966)
Naranjas 'Valencia'	2.0	15	1.1	90	Chace (1969)
Naranjas 'Navel'	2	15	4.4	120	Fantástico et.al (1976)
Plátanos 'Gros Michel'	5	5	11.7	20	Wardlaw (1940)
Toronjas 'Marsh'	5	2.5	10.0	60	Chace et. al (1967)

FUENTE: Fisiología de la postrecolección, manejo y utilización de frutas tropicales y subtropicales. Fantástico ER. B. CECSA (1979); HortScience 17(2): 162-165 (1982).

V. Almacenamiento en atmósferas modificadas.

A diferencia de la atmósfera controlada, la modificada no intenta controlar la atmósfera en concentraciones específicas.

Este método implica el uso de películas semipermeables para envasar frutos u hortalizas. Con ellas se logra de manera sencilla y barata, aumentar las concentraciones de CO₂, bajar las de O₂ y mantener una humedad elevada en la atmósfera, los cuales

son factores relacionados con la aminoración del daño por frío. (141)

El empleo de envases de película en combinación con la refrigeración para atenuar el daño por frío, presenta muchos problemas, debido a la variación en la actividad metabólica de los diferentes frutos y hortalizas.

Para desarrollar una atmósfera modificada benéfica, debe considerarse que depende obviamente de los productos de la respiración, pero estos a su vez de la temperatura, humedad, tiempo de permanencia, la cantidad y el peso del producto, entre otros. Además, el tipo y el grueso de la película, el método de fabricación y cierre, también afectan los niveles de CO₂ y O₂ en el interior del envase. (141)

Por ejemplo, Miller y Risse (1986) no obtuvieron reducción en la incidencia del daño por frío en pimientos Bell mantenidos a 7, 14 o 21 días a 1, 4 o 7 °C con 5 días adicionales a 15 °C para evaluar el efecto de la envoltura plástica. (140)

Sin embargo, se ha reportado que un control cuidadoso ha dado muy buenos resultados para prevenir o reducir la disfunción fisiológica en aguacates Hass y Fuerte (Scott y Chaplin, 1978), en toronjas (Grierson, 1971; Wardowski et. al, 1975) y en varios cultivares de cítricos (Ben-Yehoshua et. al, 1981). (7, 118, 134)

Ben-Yehoshua (1985) recomienda un curado del fruto por una semana a 21 °C, previo a su exposición a bajas temperaturas

con cubiertas plásticas individuales. (7)

VI. Almacenamiento hipobárico.

Este método está basado en la reducción de la presión que ejerce sobre el material almacenado, lo cual se consigue al sustituir la atmósfera de aire normal por 100 % N₂.

Son términos sinónimos para referirse al almacenamiento hipobárico, el almacenamiento en nitrógeno, vacío parcial y presión subatmosférica. (111)

Combinado con la baja temperatura ha resultado satisfactorio para incrementar la vida de anaquel así como para disminuir el daño por frío. Varias de las condiciones recomendadas se exponen a continuación.

Puede evitarse el daño por bajas temperaturas en aguacates almacenados a 60 mmHg y 6 °C por 5 semanas (Apelbaum et. al. 1977); mangos por 3 - 4 semanas, con 50-70 mmHg, 13 °C y luego madurados a 21 °C por espacio de 3 a 4 días (Apelbaum et. al. 1977; Spalding y Reeder, 1977); limas y toronjas con 220 mmHg, 4.5 °C por 7 y 4 semanas respectivamente (Pantástico et. al. 1968) y plátanos con 220 mmHg, 5 °C por 1 mes, pero si se almacenan a 150 mmHg y 14 °C solo duran 120 días, sin presencia de daño (Pantástico, 1967). (112)

Una explicación del como se evita el daño por frío con este método la ofrece Lyons (1973), sugiriendo que el empleo de las bajas presiones podría remover varios metabolitos volátiles tales

como, acetaldehído, etanol y α -farneseno, que están implicados en el síndrome del daño por frío.¹¹² Sin embargo, aún no existe un mecanismo que lo explique.

14. BIBLIOGRAFIA.

Articulos.

1. Accorsi C.A., Biondi G., Brigati S. (1981).
Histological changes in cold-damaged fruits. *Frutticoltura*, 43
(1): 46 - 51 .
2. Albrechts E.E. and Howard C.M. (1985). Short-term cold
storage and soil fertility during plant and fruit production on
growth and fruiting of strawberry. *HortScience* 20 (7): 411 - 413.
3. Apeland J. (1966). Factors affecting the sensitivity
of cucumbers to chilling temperatures. *Science et Technique du
Froid, Refrigeration Science and Technology*. 325 - 333.
4. Appleman C.O. and Brown R.G. (1946). Relation of
anaerobic to aerobic respiration in some storage organs with
special reference to the Pasteur effect in higher plants. *Amer.
Journal of botany* 33: 170 - 181 .
5. Aszalos A., Yang G.C. and Gottesman M.M. (1985).
Depolymerization of microtubules increases the motional freedom of
molecular probes in cellular plasma membranes. *J. Cell. Biol.*
100: 1357 - 1362 .
6. Basso L.C. and Smith T.A. (1974). Effect of mineral
deficiency on amino formation in higher plants. *Phytochemistry*
13: 875 - 883 .

7. Ben-Yehoshua S. (1985). Individual seal-packaging of fruit and vegetables in plastic film: A new postharvest technique. HortScience 20 (1): 32 - 37.

8. Bennett A.E., Smith G.M. and Nichols E.G. (1987). Regulation of climacteric respiration in ripening avocado fruit. Plant Physiol. 83, 973 - 976.

9. Bramlage W.J. (1982). Chilling injury of crops of temperate origin. HortScience 17(2): 165 - 168 .

10. Eulen W.A., Vanner J.E. and Burrell R.C. (1952). Separation of organic acids from plant tissues. Analytical Chemistry, 24 (1) : 187 - 190.

11. Carter J.V. and Wick S.M. (1984). Irreversible microtubule depolymerization associated with freezing injury in *Allium cepa* root tip cells. Cryo-Lett 5: 373 - 382 .

12. Chalutz E., Walks J. and Schiffmann-Nadel M. (1985). Reducing susceptibility of grapefruit to chilling injury during cold treatment. HortScience 20 (2): 226 - 228.

13. Chin C. and Frenkel C. (1977). Upsurge in respiration and peroxide formation in potato tubers as influenced by ethylene, propylene and cyanide. Plant Physiol. 59: 515 - 518.

14. Christiansen M.N. (1979). Physiological bases for resistance to chilling. HortScience, 14 (5): 583 - 585.

15. Clark-Walter G.O. and Linnane A.W. (1967). J. Cell Biol. 34, 1.

16. Cohen E. (1988). Commercial use for long-term storage of lemon with intermittent warming. HortScience 23 (2): 400.

17. Cooper F. and Ort D.R. (1988). Changes in protein synthesis induced in tomato by chilling. Plant Physiol. 88: 454 - 461.

18. Couey H.M. (1982). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. HortScience 17 (2): 162 - 165.

19. Davies J.N. and Ronald J.K. (1976). Some changes in the composition of the fruit of the Glasshouse Cucumber (Cucumis sativus) during growth, maturation and senescence. Journal of the Science of food and agriculture. 27 (5): 413 - 418.

20. Day D.A. and Lambers H. (1983). The regulation of glycolysis and electron transport in roots. Physiol. Plant, 58: 155 - 160.

21. Dizengremel P., Chauveau M. and Roussau: J. (1982). Inhibition by adenine derivatives of the cyanide-insensitive electron transport pathway of plant mitochondria. Plant Physiol. 70: 585 - 589.

22. Dogras C.C., Dille: D.R. and Herner R.C. (1977). Phospholipid biosynthesis and fatty acid content in relation to chilling injury during germination of seeds. Plant Physiol., 60: 897 - 902.

23. Eaks I. and Leonard L.M. (1956). Respiration of cucumber fruits associated with physiological injury at chilling temperatures. Plant Physiol., 31: 308 - 314.

24. Englington G. and Hunneman D.H. (1968).
Phytochemistry, 7: 313.
25. Ennis D.M. and O'Sullivan J. (1979). Cucumber
quality- A review. J. Food Sci., 44 (1): 186 + 189.
26. Evensen K.B. (1984). Calcium effects on ethylene and
ethane production and L-aminocyclopropane-L-carboxylic acid
content in potato disks. Physiol. Plant, 60: 125 - 128
Copenhagen.
27. Fishwick M.J., Anthony J.W. and Terence G. (1977).
Quantitative composition of the lipids of cucumber fruit (Cucumis
sativus). J. Sci. Fd. Agric., 28: 394 - 398.
28. Forss D.A., Dunstone E.A., Ramshaw E.H. and Stern W.
(1962). The flavor of cucumbers. J. Food Sci., 27: 90 - 93.
29. Fukushima T., Yamazaki M. and Tsugiyama T. (1977).
Chilling injury in cucumbers fruits. I. Effects of storage
temperature on symptoms and physiological changes. Scientia
Hortic., 6: 185 - 197.
30. Fukushima T. and Tsugiyama T. (1977). Chilling injury
in cucumber fruits. II. Chemical analyses of leakage substances
and anatomical observation of symptoms. Scientia Hortic., 6: 199-
206.
31. Fukushima T., Yamazaki M. and Odazima T. (1977).
Chilling injury in cucumber fruits. III. Dynamic changes of
osmotic quantities and the importance of cell wall rigidity.
Scientia Hortic., 6: 311 - 321.

32. Fukushima T., Yamazaki M. and Odadima T. (1977). Chilling injury in cucumber fruits. IV. The analogy between osmotic-stress injury and chilling injury. *Scientia Horti.*, 6: 323 - 331.
33. Fukushima T. and Yamazaki M. (1978). Chilling injury in cucumbers. V. Polysaccharide changes in cell walls. *Scientia Horti.*, 8: 219 - 227.
34. Fukushima T. (1978). Chilling injury in cucumber fruits. VI. The mechanism of pectin de-methylation. *Scientia Horti.*, 9: 215 - 226.
35. Galliard T., Jennifer A.M., Michael J.F. and Anthony J.W. (1976). The enzymic degradation of lipids resulting from physical disruption of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. *Phytochemistry*, 15 (11): 1647 - 1e50.
36. Gordon W.L. (1960). Ethylene production by tomato and apple fruits. *Nature*, 186: 902 - 903.
37. Grierson W., Soule J. and Kawada K. (1982). Physiological aspects of physiological stress. *Hort. Rev.*, 4: 247-271.
38. Gross K.C. and Chien Yi Wang (1984). Compositional changes in cell wall polysaccharides from chilled and non-chilled cucumber fruit. *Phytochemistry*, 23 (8): 1575 - 1578.
39. Haard N.F. and Hultin H.O. (1970). *J. Food. Sci.*, 35: 751.

40. Haard N.F. (1972). Symposium: Biochemical control systems. Membrane structure and cellular death in biological tissue. J. Food Sci., 37: 504.

41. Hand D.W. (1983). Glasshouse cucumbers. The glasshouse crops Research Institute, annual report. England C.C.R.I.

42. Handley L.W., David M.F. and Roger F.M. (1983). Carbohydrate changes during maturation of cucumber fruit. Plant Physiol., 72: 498 - 502.

43. Hasegawa S., Maier V.P., Kaszycki H.P. and Crawford J.K. (1969). Polygalacturonase content of dates and its relation to maturity and softness. J. Food Sci., 34: 527 - 529.

44. Hatton T.T. and Cubbedge R.H. (1983). Preferred temperature for prestorage conditioning of 'Marsh' grapefruit to prevent chilling injury at low temperatures. HortScience, 18 (5): 721 - 722.

45. Hemmila-agner A.M., Verschoor E.J. and Van der Plas L.H. (1983). Alternative pathway respiration in vivo of potato tuber callus grown at various temperatures. Physiol. Plant, 59: 369 - 374 Copenhagen.

46. Hetherington S.E., He J. and Smillie R.M. (1989). Photoinhibition at low temperature in chilling-sensitive and resistant plants. Plant Physiol., 90, 1609 - 1615.

47. Hobson G.E. (1962). Determination of Polygalacturonase in fruits. Nature, 195: 804 - 805.

48. Hrubec T.C., Robinson J.M., Robert P.D. (1985). Isolation of mitochondria from Soybean leaves on discontinuous percoll gradients. *Plant Physiol.*, 77: 1010 - 1012.
49. Hultin H.O. (1972). Enzymic activity and control as related to subcellular localization. *J. Food Sci.*, 37: 524 - 529.
50. Jackson C., Jane E.D., David O.H. and Anthony L.M. (1979). Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. *Plant Physiol.*, 64: 150 - 153.
51. Jian L., Sun L. and Dong H. (1982). Adaptive changes in ATP-asa activity in the cells of winter wheat seedlings during cold hardening. *Plant Physiol.*, 70: 127 - 131.
52. John J.B. and Christiansen M.N. (1976). Inhibition of linolenic acid synthesis and modification of chilling resistance in cotton seedlings. *Plant Physiol.*, 57: 257 - 259.
53. Jona R. and Foa E. (1979). Histochemical survey of cell-wall polysaccharides of selected fruits. *Scientia Hort.*, 10: 141 - 147.
54. Kader A.A. (1985). Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. *HortScience*, 20 (1): 54 - 57.
55. Kamps T.L., Isleib G.T., Herner C.R. and Sink C.K. (1987). Evaluation of techniques to measure chilling injury in tomato. *HortScience*, 22 (6): 1309 - 1312.

56. Kane Dusmane, Marcellin Pierre y Mazliak Paul (1978). Incidence of ripening and chilling injury on the oxidative activities and fatty acid compositions of the mitochondria from mango fruits. *Plant Physiol.*, 61: 634 - 638.
57. Kiener C.M. and Bramlage W.J. (1981). Temperature effects on the activity of the alternative respiratory pathway in chill-sensitive- Cucumis sativus. *Plant Physiol.*, 68: 1474 - 1478.
58. Kinsella J.E. (1975). Composition of the lipids of cucumber and peppers. *J. Food Sci.*, 36: 865.
59. Kosiyachinda S. and Young R.E. (1977). Succinoxidase activity of avocado fruit mitochondria in relation to temperature and chilling injury throughout the climacteric cycle. *Plant Physiol.*, 60: 470 - 474.
60. Lu H.S., Harlan J.F., Arthur R.S. and William M.H. (1968). Isolation of active mitochondria from tomato fruit. *Plant Physiol.*, 43: 883 - 887.
61. Kusper P.J.C. (1985). Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. *Physiol. Plant*, 64 : 118 - 122.
62. Kushad M.M. and Yelenosky G. (1987). Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiol.*, 84: 692 - 695.

63. Labate C.A. and Leegood R.C. (1989). Influence of low temperature on respiration and contents of phosphorylated intermediates in darkened barley leaves. *Plant Physiol.*, 91: 905-910.

64. Lambers H., Day D.A. and Azcon-Bieto J. (1983). Cyanide-resistant respiration in roots and leaves. Measurements with intact tissues and isolated mitochondria. *Physiol. Plant*, 58: 148 - 154 Copenhagen.

65. Lambers H., Szariawski R.K. and Ries de Visser (1983). Respiration for growth, maintenance and ion uptake. An evaluation of concepts, methods, values and their significance. *Physiol. Plant*, 58: 556 - 563 Copenhagen.

66. Liang Yu,eng, Shang-Qing and Shan-Tao (1982). The time-temperature relation of chilling injury to cucumber in refrigerated storage in refrigeration of perishable products for distant markets Paris France. *Institut International du Froid*. 247 - 251.

67. Lin T.Y., Shewfelt R.L. and Wilkinson R.E. (1985). Changes in mitochondrial properties during low temperature storage of apples. *J. Food Sci.*, 50: 1227 - 1229.

68. Lin Tang H.C. and McFeeters R.F. (1983). Relationships among cell wall constituents, calcium and texture during cucumber fermentation and storage. *J. Food Sci.*, 46: 66 - 70.

69. Lizada M.C. and Shang F.Y. (1979). A simple and sensitive assay for L-aminocyclopropane-L-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry*, 100: 140 - 145.

70. Lyons J.M. and Raison J.K.. A temperature-induced phase change in mitochondrial membranes and its relationship to chilling injury in plant tissues. *Proceedings of the XIII International Congress of Refrigeration*, 167 - 172.

71. Lyons J.M., Wheaton T.A. and Pratt H.K. (1964). Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.*, 39: 262 - 268.

72. Lyons J.M. and Raison J.K. (1970). Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.*, 45: 386 - 389.

73. Markhart III A.H. (1986). Chilling injury: A review of possible causes. *HortScience*, 21 (6): 1329 - 1333.

74. McCollum T.G. (1989). Physiological changes in yellow summer squash at chilling and non-chilling temperatures. *HortScience*, 24 (4): 633 - 635.

75. McCombs C.L., Sox H.N. and Lower R.L. (1976). Sugar and dry matter content of cucumber fruits. *HortScience*, 11 (3): 245 - 247.

76. McDonald R.E. (1989). Temperature-conditioning affects polyamines of lemon fruits stored at chilling temperatures. *HortScience*, 24 (3): 475 - 477.

77. McDonald R.E. and Kushad M.M. (1986). Accumulation of Putrescine during chilling injury of fruits. Plant Physiol., 82: 324 - 326.

78. McFeeters R.F., Fleming H.F. and Thompson R.L. (1982). Malic and citric acids in pickling cucumbers. J. Food Sci., 47: 1859 - 1862.

79. McGlasson W.B. (1985). Ethylene and fruit ripening. HortScience, 20 (1): 51 - 55.

80. Miller W.R. and Risse L.A. (1986). Film wrapping to alleviate chilling injury of bell peppers during cold storage. HortScience, 21 (3): 467 - 468.

81. Minamikawa T., Akazawa T. and Uritani I. (1961). Mechanism of cold injury in sweet potatoes. 11. Biochemical mechanism of cold injury with special reference to mitochondrial activities. Plant and Cell Physiol., 2: 301 - 309.

82. Mohapatra S.S., Foole R.J. and Dhindsa R.S. (1988). Alterations in membrane protein-profile during cold treatment of alfalfa. Plant Physiol., 86: 1005 - 1007.

83. Morris L.L. (1982). Chilling injury of horticultural crops: an overview. HortScience, 17 (2): 161 - 162.

84. Murata T. (1959). Physiological and biochemical studies of chilling injury in bananas. Physiologia plantarum, 22: 401 - 411.

85. Moreau F. and Romani R. (1982). Malate oxidation and cyanide insensitive respiration in avocado mitochondria during the climacteric cycle. *Plant Physiol.*, 70: 1385 - 1390.

86. Murata N. and Yamaya J. (1984). Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Physiol.*, 74: 1016-1024.

87. Nordby H.E. and Yelenosky G. (1982). Relationships of leaf fatty acids to cold hardening of citrus seedlings. *Plant Physiol.*, 70: 132 - 135.

88. Nordby H.E., Furvis A.C. and Yelenosky G. (1987). Lipids in peel of grapefruit and resistance to chilling injury during cold storage. *HortScience*, 22 (5): 915 - 917.

89. Omran R.G. (1980). Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol.*, 65: 407 - 408.

90. O'Neill S.D. and Leopold A.C. (1982). An assessment of phase transitions in soybean membranes. *Plant Physiol.*, 70: 1405 - 1409.

91. Palmer J.M. (1967). Rapid isolation of active mitochondria from plant tissue. *Nature*, 216: 1206.

92. Farlin K.L. and Shu-Jung Kuo (1989). Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv. hybrid C.) fruit. *Plant Physiol.*, 90: 1049 - 1056.

93. Patel D.S. and Phaff H.J. (1960). Studies on the purification of tomato polygalacturonase. Food Res., 25: 37 - 46.
94. Patterson B.D.,Fayne L.A.,Chen Y. and Graham D. (1984). An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants. Plant Physiol., 76: 1014 - 1018.
95. Peng A.C. and Geisman J.R. (1978). Lipid and fatty acid composition of cucumbers and their changes during storage of fresh-pack pickles. J. Food Sci., 41: 859 - 862.
96. Phillips D.R. and Galliard T. (1976). Flavor biogenesis. Partial purification and properties of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from fruits of cucumber. Phytochemistry, 17: 355 - 358.
97. Poenicke E.F.,Kays S.J.,Smittle D.G. and Williamson R.E. (1977). Ethylene in relation to postharvest quality deterioration in processing cucumbers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 102 (3): 303 - 306.
98. Pressey R. and Avants J.F. (1975). Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. Plant Physiol., 52: 252 - 256.
99. Pressey R. and Avants J.F. (1975). Cucumber polygalacturonase. J. Food Sci., 40: 937 - 939.
100. Furvis A.C. (1980). Influence of canopy depth on susceptibility of 'Marsh' grapefruit to chilling injury. HortScience, 15 (6): 701 - 702.

101. Purvis A.C. (1989). Soluble sugars and respiration of flavedo tissue of grapefruit stored at low temperatures. HortScience, 24 (2): 320 - 322.

102. Purvis A.C. and Yelenosky G. (1983). Translocation of carbohydrates and proline in young grapefruit trees at low temperatures. FLant Physiol., 73: 877 - 880.

103. Richards F.T. and Coleman (1952). Occurrence of Putrescine in potassium deficient barley. Nature, 170: 460.

104. Rikin A., Atsmon D. and Gitler C. (1980). Chilling injury in cotton (Gossypium hirsutum L.): effects of antimicrotubular drugs. Plant Cell Physiol., 21: 829 - 837.

105. Rikin A. and Richmond A.E. (1976). Amelioration of chilling injuries in cucumber seedlings by abscisic acid. Physiol. Plant, 38: 95 - 97.

106. Romani R.J. (1972). Stress in the postharvest cell: The response of mitochondria and ribosomes. J. Food Sci., 37: 513 - 517.

107. Romani R.J., Eos T.J. and Pech J.C. (1981). Cycloheximide stimulation of cyanide-resistant respiration in suspension cultures of senescent pear fruit cells. Plant Physiol., 68 : 823 - 826.

108. Sakiyama R., Nakamura Y. and Nakamura S. (1978). Effect of parthenocarpy, peeling and fruit age on the changes in volume and specific gravity of cucumber fruits during storage at 20 °C. Scientia Hort., 8: 229 - 236.

109. Saltveit M.E. (1978). Simple apparatus for diluting and dispensing trace concentrations of ethylene in air. HortScience, 13 (3): 249 - 251.

110. Saltveit M.E. Jr. and Cabrera R.M. (1987). Tomato fruit temperature before chilling influences ripening after chilling . HortScience, 22 (3): 452 - 454.

111. Saltveit M.E. Jr. and Dilley D.R. (1978). Rapidly induced wound ethylene from excised segments of etiolated Pisum sativum L. cv. Alaska. Plant Physiol., 51: 447 - 450.

112. Saltveit M.E. Jr. and McFeeters R.F. (1980). Polygalacturonase activity and ethylene synthesis during cucumber fruit development and maturation. Plant Physiol., 66: 1019 - 1023.

113. Sawamura M., Knegt E. and Bruinsma J. (1978). Levels of endogenous ethylene, carbon dioxide and soluble pectin and activities of pectin methylesterase and polygalacturonase in ripening tomato fruits. Plant and Cell Physiol., 19 (6): 1061 - 1069.

114. Schwimmer B. (1967). Biochem. Biophys. 130: 312.

115. Scott H.J. and Chaplin G.R. (1978). Reduction of chilling injury in avocados stored in sealed polyethylene bags. Trop. Agric. (Trinidad), 55 (1): 87 - 90.

116. Sherman M. (1985). Control of ethylene in the postharvest environment. HortScience, 20 (1): 57 - 60.

117. Schonbaum G.R., Bonner W.D. Jr., Storey B.T. and Bahr J.T. (1971). Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.*, 47: 124 - 128.

118. Siedow J.N. and Berthold D.A. (1986). The alternative oxidase: A cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. *Physiol. Plant*, 66: 569 - 573.

119. Sobezyk E.A., Anna M. and Aline K. (1985). ATP involvement in plant tissue responses to low temperature. *Physiol. Plant*, 63: 399 - 405 , Copenhagen.

120. Solomos T. and Laties G.G. (1974). Similarities between the actions of ethylene and cyanide in initiating the climacteric and ripening of avocados. *Plant Physiol.*, 54: 506 - 511.

121. Stokes D.M., Anderson J.W. and Rowan K.S. (1968). The isolation of mitochondria from potato-tuber tissue using sodium metabisulphite for preventing damage by phenolic compounds during extraction. *Phytochemistry*, 7: 1509 - 1512.

122. Szaniawski R.k. (1985). Homeostasis in cucumber plants during low temperature stress. *Physiol. Plant*, 64: 212 - 216, Copenhagen.

123. Tang H.C.L. and McFeeters R.F. (1983). Relationships among cell wall constituents, calcium and texture during cucumber fermentation and storage. *J. Food Sci.*, 48: 66 - 70.

124. Theologis A. and Laties G.G. (1978). Antimycin-insensitive cytochrome-mediated respiration in fresh and aged potato slices. Plant Physiol., 62: 238 - 242.
125. Theologis A. and Laties G.G. (1978). Respiratory contribution of the alternate path during various stages of ripening in avocado and banana fruits. Plant Physiol., 62: 249 - 255.
126. Theologis A. and Laties G.G. (1978). Relative contribution of cytochrome-mediated and cyanide-resistant electron transport in fresh and aged potato slices. Plant Physiol., 62: 232 - 237.
127. Theologis A. and Laties G.G. (1982). Selective enhancement of alternative path capacity in plant storage organs in response to ethylene plus oxygen: A comparative study. Plant Physiol., 69: 1036 - 1039.
128. Uritani I. and Yamaki S. (1969). Mechanism of chilling injury in sweet potatoes. Part III. Biochemical mechanism of chilling injury with special reference to mitochondrial lipid components. Agr. Biol. Chem., 33 (4): 480 - 487.
129. Vázquez R.O. and Colinas M.L. (1990). Changes in guavas of three maturity stages in response to temperature and relative humidity. HortScience, 25 (1): 86 - 87.

130. Verleur J.D. (1965). Studies on the isolation of mitochondria from potato tuber tissue. Plant Physiol., 100: 1003 - 1007.

131. Wang C.Y. and Baker J.E. (1979). Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. Plant and cell Physiol., 20 (1): 243 - 251 .

132. Wang C.Y. and Adams D.O. (1980). Ethylene production by chilled cucumbers (Cucumis sativus L.). Plant Physiol., 66: 841 - 843.

133. Wang C.Y. and Adams D.O. (1982). Chilling-induced ethylene production in cucumbers (Cucumis sativus L.). Plant Physiol., 69: 424 - 427.

134. Wang C.Y. (1982). Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. HortScience, 17 (2) 173 - 186.

135. Wardale D.A., Lambert E.A. and Galliard T. (1978). Localization of fatty acid hydroperoxide cleavage activity in membranes of cucumber fruit. Phytochemistry, 17: 205 - 212.

136. Whitehouse D.G., Fricaud A. and Moore A.L. (1989). Role of Nonhmicity in the regulation of electron transport in plant mitochondria. Plant Physiol., 91: 487 - 492.

137. Wild B.L. and Hood C.W. (1989). Hot dip treatments reduce chilling injury in long-term storage of 'Valencia' oranges. HortScience, 24 (1): 109 - 110.

138. Willing R.P. and Leopold A.C. (1983). Cellular expansion at low temperature as a cause of membrane lesions. *Plant Physiol.*, 71: 118 - 121.

139. Wolk W.D. and Herner R.C. (1982). Chilling injury of germinating seeds and seedlings. *HortScience*, 17 (2): 169 - 173 .

140. Wu S. and Laties G.G. (1983). A malate-oxaloacetate shuttle linking cytosolic fatty acid α -oxidation to the mitochondrial electron transport chain in uncoupled fresh potato slices. *Physiol. Plant*, 58: 81 - 88, Copenhagen.

141. Yamaji S. and Uritani I. (1972). Mechanism of chilling injury in sweet potatoes. Part V. Biochemical mechanism of chilling injury with special reference to mitochondrial lipid components. *Agr. Biol. Chem.*, 36: 47 - 55.

142. Yang S.F. (1985). Biosynthesis and action of ethylene. *HortScience*, 20 (1): 41 - 45.

143. Yu M.H., Olson L.E. and Salunke D.K. (1968). *Phytochemistry*, 7: 561.

Libros.

144. Badui D.S. (1982). *Quimica de los alimentos*. Editorial Alhambra S.A., 1a. ed., Mexico.

145. Eidwell R.G.S. (1987). *Fisiologia vegetal*; A.G.T. editor S.A., Mexico.

146. Bondi A. (1988). *Processed plant protein foodstuffs*. Academic Press N.Y..

147. Bonner y Galston (1970). Principios de fisiología vegetal, Aguilar S.A. de Ediciones, Madrid, España.
148. Borgstrom G. (1968). Principles of food science II. Food microbiology and biochemistry. McMillan, London.
149. Braverman J.B.S. (1980). Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ed. El manual moderno S.A. de C.V., Mexico.
150. Davies D.D. (1980). The biochemistry of plants. Vol.2 Metabolism and respiration. Academic Press. I.N.C.N.Y.,U.S.A..
151. Devlin R.M. (1980). Fisiología vegetal. Ediciones Omega S.A., 3a. ed., Barcelona, España.
152. Dossat R.J. (1981). Principios de refrigeración. C.E.C.S.A., 2a. ed., Mexico.
153. Fennema O.R. (1982). Introducción a la ciencia de los alimentos. Editorial Reverte, S.A., Barcelona, España.
154. Hall J.L., Flowers F. and Robert F.M. (1974). Plant cell structure and metabolism. Longman Grove Limited.
155. Hansen E.. Postharvest physiology of fruits.
156. Hulme A.C. (1970). Biochemistry of fruits and their products. Vol. 1., Academic Press, N.Y..
157. Lehninger A.L., Bioquímica. Ediciones Omega S.A., Barcelona, España.
158. Manuales técnicos para la elaboración de cursos de capacitación: Almacenamiento de frutas y hortalizas. CONAFRUT-SARH. Mexico.

159. Morrison T., By Boyd H.F., Quimica organica. Fondo educativo interamericano, S.A..

160. Mosqueira R.S. (1965). Fisica general. Editorial Patria, Mexico.

161. Fantastico E.F. B. (1979). Fisiologia de la postrecoleccion, manejo y utilizacion de frutas tropicales y subtropicales, C.E.C.S.A., 1a. ed., Mexico.

162. Schuphan W. (1970). Proteins as human food. AVI Publ., Westport, Conn.

163. Stumpf P.R. and Conn E.E. (1980). The biochemistry of plants, Vol. 3 Carbohydrates: structure and function. Academic Press, I.N.C., N.Y., U.S.A..

164. Tablas de valor nutritivo de los alimentos editadas por el Instituto Nacional de Nutricion, Mexico.

165. Van Lancker J.L. (1970). Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis W.H. Fishman, ed. Vol.1 Academic Press, I.N.C., N.Y., U.S.A..

166. Weier T.E. and Benson A.A. (1968). The molecular nature of chloroplast membranes In T.W. Goodwin (ed) Biochemistry of chloroplast. Academic Press, I.N.C., N.Y., U.S.A..