

## DAÑOS POR FRÍO EN ZAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn). II. CAMBIOS EN FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### CHILLING IN SAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn). II. CHANGES IN TOTAL PHENOLS AND ENZYMATIC ACTIVITY

Irán Alía Tejacal<sup>1\*</sup>, María Teresa Colinas León<sup>2</sup>, María Teresa Martínez Damián<sup>2</sup> y  
Ramón Marcos Soto Hernández<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, C. P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México. Correo electrónico: ijac96@yahoo.com.mx <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México- Texcoco. C. P. Chapingo, Estado de México. <sup>3</sup>Programa en Botánica, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Edo. de México.

\* Autor para correspondencia

#### RESUMEN

En frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) se estudió la maduración a temperatura ambiente (20 °C; 50-60 % HR) y el comportamiento de este proceso durante y después del almacenamiento a bajas temperaturas (5, 10 y 15 °C; 80-85 % HR). Durante el cambio de madurez fisiológica a madurez de consumo en los frutos de zapote mamey almacenados a 20 °C por 12 d los fenoles totales disminuyeron de 1653 a 646 mg kg<sup>-1</sup> y la actividad de polifenol oxidasa (PFO) se incrementó de 23.8 a 53.1 U g<sup>-1</sup>, y al mismo tiempo disminuyó la astringencia. La peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) incrementaron su actividad de la madurez fisiológica a la madurez de consumo, de 383 a 2104, de 11.4 a 21 y de 6.7 a 28.5 U g<sup>-1</sup>, respectivamente. La proteína soluble aumentó de 82 en la madurez fisiológica a 950 mg kg<sup>-1</sup> en la madurez de consumo. El almacenamiento a 5 °C retrasa la disminución de los fenoles totales (555.6 mg kg<sup>-1</sup>) e inhibió la actividad de PFO (11.2 U g<sup>-1</sup>) 8 d después de haber sido transferidos a 20 °C; disminuyó la actividad enzimática de CAT (14.5 U g<sup>-1</sup>) y SOD (6.4 U g<sup>-1</sup>), así como la concentración de la proteína soluble (251.7 mg kg<sup>-1</sup>) durante el mismo periodo. POD fue inhibida durante el almacenamiento, pero alcanzó valores similares al testigo (2443.4 U g<sup>-1</sup>) 8 d después transferirse a 20 °C. El almacenamiento a 10 °C provocó efectos similares que la temperatura de 5 °C pero en menor intensidad. Los frutos almacenados a 15 °C no fueron afectados negativamente en sus actividades enzimáticas, proteína soluble y concentración de fenoles totales. Por tanto, la inhibición de la actividad de enzimas antioxidantes fue afectada negativamente por el almacenamiento a temperaturas menores de 10 °C y estuvo asociada a daños por frío en frutos de zapote mamey.

**Palabras clave:** *Pouteria sapota*; catalasa, superóxido dismutasa, fenoles, daños por frío.

#### SUMMARY

Ripening of sapote mamey fruits (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore and Stearn) at room temperature (20 °C, 50-60 % RH) and

during and after low temperature storage (5, 10, and 15 °C, 80-85 % RH) was studied. From maturity to ripening fruits stored at 20 °C for 12 d showed a decrease in total phenolics from 1653 to 646 mg kg<sup>-1</sup> and the activity of polyphenoloxidase (PFO) increased from 23.8 to 53.1 U g<sup>-1</sup>, and at the same time astringency was reduced. Activities of peroxidase (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were increased from maturity to ripening from 383 to 2104, 11.4 to 21 and 6.7 to 28.5 U g<sup>-1</sup> respectively. Soluble protein increased from 82 at maturity to 950 mg kg<sup>-1</sup> when ripe. Storage at 5 °C delayed the decrease in total phenolics content (555.6 mg kg<sup>-1</sup>) and PFO activity was inhibited (11.2 U g<sup>-1</sup>) for 8 d after transferred to 20 °C; there was a decrease in the activities of CAT (14.5 U g<sup>-1</sup>) and SOD (6.4 U g<sup>-1</sup>) as well as of total soluble protein (251.7 mg kg<sup>-1</sup>) during the same period. POD was inhibited during storage, but it showed similar activity (2443.4 U g<sup>-1</sup>) to the control after transfer to 20 °C. Storage at 10 °C induced similar effects to those obtained at 5 °C but at a lower intensity. At 15 °C the enzyme activities, soluble protein and total phenolics did not show a negative behavior. Therefore, the antioxidant enzymes were negatively affected were by storage temperatures lower than 10 °C and this was associated with chilling injury in sapote mamey fruits.

**Index words:** *Pouteria sapota*, catalase, superoxide dismutase, phenols, chilling injury.

#### INTRODUCCIÓN

El zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) es un fruto climatérico (Henríquez, 1973) que madura rápidamente después de la cosecha entre 3 y 10 d (Balerdi y Shaw, 1998). Para incrementar su vida poscosecha recientemente se ha estudiado su comportamiento durante y después del almacenamiento a bajas temperaturas (Diaz *et al.*, 2000; Alía *et al.*, 2002). Las frutas de origen tropical son especialmente sensibles a las bajas temperaturas de almacenamiento, por lo que se han buscado

parámetros óptimos de conservación y transporte con el fin de mantener el mayor tiempo posible su calidad integral ante el consumidor (Pérez *et al.*, 1999). La actividad enzimática en dichos frutos ha servido como indicador de alteraciones metabólicas intrínsecas que se manifiestan como desordenes fisiológicos externos (Pérez *et al.*, 1999).

El oscurecimiento que ocasiona el daño por frío en frutos y vegetales se ha asociado con el metabolismo de fenoles (Salveit y Morris, 1990). Cantwell *et al.* (2001) determinaron que en la raíz de jícama (*Pachyrhizus erosus*) el daño por frío induce un aumento en la concentración de fenoles y oscurecimiento de tejidos. En la degradación oxidativa de compuestos fenólicos las enzimas polifenol oxidasa (EC. 1.14.18.1; PFO) y peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POD) son relevantes en términos de calidad, ya que conducen al oscurecimiento (Tomás y Espín, 2001). En la actualidad se conoce que la PFO cataliza dos diferentes reacciones en presencia de oxígeno molecular: a) la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles, y b) la oxidación de ortodifenoles a ortoquinonas (Walker, 1995). Por ser muy reactivas, las ortoquinonas son objeto de posteriores reacciones secundarias que finalmente llevan a la formación de compuestos coloridos (Walker, 1995). La POD cataliza transformaciones oxidativas de reactantes orgánicos con peróxido de hidrógeno como oxidante (van de Velde *et al.*, 2001). El papel de la POD en el oscurecimiento enzimático no es claro, pero se ha propuesto que puede estar involucrada en procesos lentos tales como el oscurecimiento interno, y un efecto sinérgico con PFO no se debe descartar (Tomás y Espín, 2001).

El daño por frío también es considerado como un estrés oxidativo relacionado con una disminución en enzimas que remueven especies reactivas de oxígeno, tales como superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1.; SOD) y catalasa (EC. 1.11.1.6.; CAT) (Sala, 1998). La enzima SOD cataliza la conversión de  $O_2^-$  a peróxido de hidrógeno y oxígeno, mientras que la hemoproteína CAT cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno potencialmente peligroso en oxígeno molecular y agua (Hammer, 1993). El superóxido y peróxido de hidrógeno producidos por tejidos vegetales a bajas temperaturas pueden causar la peroxidación de lípidos en la membrana (Wang, 1995), lo que puede originar una pérdida en la integridad de la membrana, estructura física y fluidez, que afecta la función apropiada de las proteínas (Shewfelt y del Rosario, 2000).

En frutos de zapote mamey existe poca información en cuanto al comportamiento de estas enzimas durante maduración, almacenamiento a bajas temperaturas y posterior transferencia a temperatura ambiente. Por tanto, el presente trabajo consistió en estudiar a estas enzimas oxidativas

involucradas en respuestas al estrés por frío de los frutos y vegetales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En Julio de 2001 se colectaron 200 frutos de material criollo de zapote mamey en Coatlán de Río, Morelos, con un peso promedio de 327 g. Los frutos fueron cosechados de acuerdo al criterio del productor, que consiste en eliminar una pequeña porción de la cáscara en el ápice y base del fruto; cuando la pulpa muestra una coloración rosanaranja se cosecha y alcanzará madurez de consumo. Estos frutos fueron cosechados en forma manual, tratando de causar el menor daño físico posible; el material experimental se uniformó por tamaño.

El material vegetal se transportó al Laboratorio de Fisiología de Frutales de la Universidad Autónoma Chapingo donde se acondicionó a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) por 5 h para posteriormente almacenar a diferentes temperaturas (Cuadro 1). El diseño experimental fue uno completamente al azar, la unidad experimental fue un fruto con cinco repeticiones; los datos del testigo sólo se utilizaron en la discusión de los resultados. Las evaluaciones de las variables se llevaron a cabo cada 2 d a temperatura ambiente en los frutos testigo. En los frutos almacenados a bajas temperaturas se realizaron evaluaciones cada 5 d durante el almacenamiento, y cada 2 d una vez transferidos a temperatura ambiente. El análisis inicial se realizó el día de cosecha y así fue considerado para todos los tratamientos.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados.

Tratamiento	Núm. de frutos
12 d a 20 °C; HR de 50-60 % (testigo)	35
20 d a 15 °C; HR de 85 % + 8 d a 20 °C; HR de 50-60 %	40
20 d a 10 °C; HR de 85 % + 8 d a 20 °C; HR de 50-60 %	40
20 d a 5 °C; HR de 85 % + 8 d a 20 °C; HR de 50-60 %	40

Las actividades enzimáticas se evaluaron a partir de polvo de acetona; éste se preparó de la manera siguiente: 40 g de pulpa más 80 mL de acetona fría (-15 °C) grado reactivo, se homogenizaron en una licuadora por 1 min; el macerado se filtró al vacío, el proceso se repitió una vez más y se dejó secar a temperatura ambiente (18-22 °C). Posteriormente, los extractos se conservaron en ultracongelador a -70 °C. El peso del polvo obtenido fue determinado en función de la relación peso fresco/peso seco.

**Fenoles totales.** Se determinaron con el método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). A partir de la solución de acetona obtenida de la preparación del polvo de acetona, se realizó una mezcla de 0.04 mL + 12 mL de agua desionizada + 1 mL del reactivo de Folin & Ciocalteu, que fue agitada por 10 s. También se agregaron 3 mL de una solución de carbonato de sodio 20 % (tiempo cero) y se aforó a 20 mL. La muestra se dejó reposar 2 h para leer su absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Milton Roy, Spectronic 21D). Se hizo una curva patrón de ácido tánico que fue reportada en mg kg<sup>-1</sup> de peso.

**Proteína soluble.** Se determinó por el método de Bradford (1976). Para ello se mezclaron 0.5 g de polvo de acetona con 5 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 7.1), en frío. La mezcla se centrifugó a 12 000 g por 20 min. A una muestra de 0.1 mL del sobrenadante se adicionaron 5 mL de la solución Coomassie Blue, se agitó y registró la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. La cuantificación se hizo mediante una curva de calibración con albúmina de bovino.

**Polifenol oxidasa (EC. 1.14.18.1; PFO).** La actividad enzimática se determinó a partir de polvo de acetona, y la PFO se evaluó mediante el método propuesto por Lamiikanra (1995) con modificaciones. La enzima se extrajo a partir de 0.2 g de polvo de acetona con 5 mL de Tris-HCl frío, 100 mM (pH 7.1) que contenía 1 % de polivinil pirrolidona (PVP). Se mezclaron en un homogenizador de tejidos durante 30 s; posteriormente la mezcla se centrifugó por 20 min a 10 000 g a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para evaluar el cambio de absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro. Para el ensayo de la actividad enzimática se emplearon 3 mL de catecol 60 mM disuelto en un amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.1 y 0.2 mL del sobrenadante. Los ensayos se realizaron a temperatura de 22 a 24 °C. La actividad enzimática se reporta como U g<sup>-1</sup> de peso fresco, donde una unidad de actividad enzimática es igual a la formación de 1 μmol de *o*-benzoquinona min<sup>-1</sup>.

**Catalasa (EC. 1.11.1.6; CAT).** La CAT se extrajo del polvo de acetona: 0.5 g se mezclaron con 5 mL de Tris-HCl 0.1 M con pH 8.5 que contenía 1 % de polivinilpirrolidona, en un homogenizador de tejidos. La mezcla se centrifugó a 12 000 g por 20 min en una centrífuga refrigerada a 4 °C. La actividad de CAT se evaluó mediante el método descrito por Lück (citado por Blackwell *et al.*, 1990), donde 3 mL de un amortiguador 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 y 0.1 mL de peróxido de hidrógeno 0.88 % en 100 mM de Tris-HCl, se mezclan en una celda de cuarzo del espectrofotómetro. La reacción se inició al adicionar 0.1 mL de extracto crudo y se observó el cambio en absorbancia a 240 nm, y la actividad enzimática se reportó como U

g<sup>-1</sup> de peso fresco, donde una unidad de actividad enzimática es igual a la descomposición de 1 μmol min<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, entre 22 y 24 °C.

**Peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POD).** La extracción de POD fue similar a PFO y el ensayo se hizo de acuerdo con el método Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: la mezcla de ensayo tuvo un volumen total de 3 mL, de los cuales 2.6 mL fueron del amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.1, 0.25 mL de guayacol 0.1 M, 0.1 mL de peróxido de hidrógeno 0.25 % y 0.05 mL del sobrenadante; se determinó el cambio de absorbancia a 470 nm en 3 min. La actividad enzimática se reporta como U g<sup>-1</sup> de peso fresco, donde una unidad de actividad enzimática es igual a la formación de 1 μmol de tetraguaicol min<sup>-1</sup>. Los ensayos se hicieron a temperatura ambiente, entre 22 y 24 °C.

**Superóxido dismutasa (1.15.1.1; SOD).** Esta enzima se evaluó a partir de 0.5 g de polvo de acetona, al cual se adicionaron 5 mL de amortiguador de fosfatos a pH de 7.8 y homogenizado por 40 s. La mezcla se centrifugó a 10 000 g durante 20 min a 0 °C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático propuesto por Beyer y Fridovich (1987), donde se propone la siguiente mezcla de reacción: 27 mL de amortiguador de fosfatos 0.05 M (pH 7.8), que contenía 0.1 mM de EDTA, 1.5 mL de L-metionina (30 mg mL<sup>-1</sup>), 1 mL de nitro blue tetrazolium (1.41 mg mL<sup>-1</sup>) y 0.75 mL de Triton X-100 al 1 %. A 3 mL de esta mezcla de reacción se adicionaron 0.03 mL de riboflavina (4.4 mg 100 mL<sup>-1</sup>) y 0.4 mL del sobrenadante; la mezcla se iluminó por 7 min con lámparas de luz fluorescente de 20 W GroLux, y se procedió a leer la absorbancia a 560 nm. El incremento en absorbancia debido a la formación de “nitro blue tetrazolium formazan” por unidad de tiempo equivale a la velocidad de reacción; y la absorbancia en ausencia de SOD y en presencia de varias cantidades de SOD se utilizó para determinar el número de unidades/mL de SOD en la solución (Stauffer, 1989). Una unidad de SOD es igual a la cantidad de sobrenadante que fotoinhibe en 50 % la formación de “nitro blue tetrazolium formazan” (Giannopolitis y Ries, 1977). Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura de ambiente, entre 22 y 24 °C.

Los datos obtenidos por fecha se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias por el método de Tukey (P ≤ 0.05), entre los tratamientos almacenados a bajas temperaturas, y los frutos almacenados a temperatura ambiente fueron utilizados como referencia. Se presentan gráficas del comportamiento de las variables evaluadas (media ± error estándar) en los frutos testigo, y se señala la comparación de medias entre los tratamientos almacenados a bajas temperaturas, por día.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fenoles totales

Las concentraciones de fenoles totales en los frutos testigo disminuyeron de 1653 mg kg<sup>-1</sup> en madurez fisiológica a 646 mg kg<sup>-1</sup> en la madurez de consumo, y luego a 66 mg kg<sup>-1</sup> en la senescencia (Figura 1). En frutos de zapote mamey provenientes de la misma región de estudio (Coatlán del Río, Morelos), Saucedo *et al.* (2001) reportan valores de 15 300 mg kg<sup>-1</sup> en madurez fisiológica y 2000 mg kg<sup>-1</sup> en la madurez de consumo, pero la extracción se realizó con metanol. Antes, Alia (Com. Personal)<sup>1</sup> registró valores de 790 mg kg<sup>-1</sup> en la madurez fisiológica que bajan a 220 mg kg<sup>-1</sup> en la madurez de consumo. Este comportamiento fue conforme al tratamiento de etileno de 2000 mg L<sup>-1</sup> por 24 h y la extracción se realizó con etanol a 80 %. Las diferencias entre los resultados obtenidos y los reportados por varios investigadores se pueden deber a que la acumulación de fenoles en frutos varía ampliamente entre especies, variedades, temporadas y localidades (Van Buren, 1970), o por el método utilizado para la determinación de los fenoles. La disminución de los fenoles se ha asociado con una disminución de la astringencia en mango (*Mangifera indica* L.) (Lizada, 1993). Los resultados del presente trabajo indican un comportamiento de los frutos de zapote mamey similar al mango.

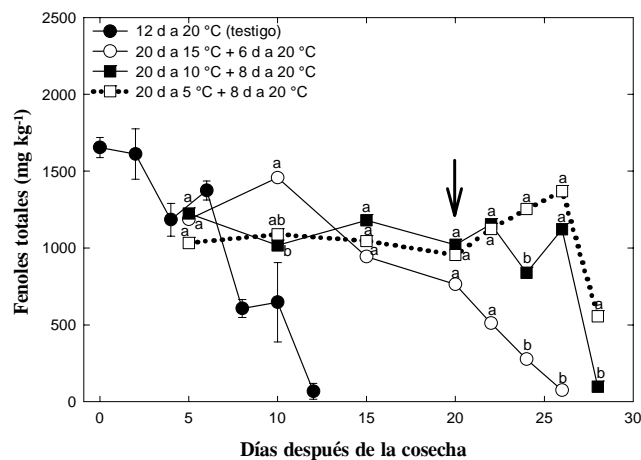


Figura 1. Comportamiento de los fenoles totales en frutos de zapote mamey almacenados a diferentes temperaturas. Cada punto indica la media de 4 observaciones  $\pm$  error estándar (Testigo). La flecha indica la transferencia a 20 °C. Medias con letras iguales entre los tratamientos a bajas temperaturas por día no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Al término del almacenamiento, las concentraciones de fenoles totales en los frutos almacenados a 5, 10 y 15 °C, fueron de 954, 1020 y 763 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 1), respectiva-

mente. Posterior a la transferencia a 20 °C, hubo una disminución continua en los fenoles de los frutos previamente almacenados a 15 °C; en cambio, en los almacenados a 10 °C la disminución fue evidente hasta después de 6 d a 20 °C, y en los frutos previamente almacenados a 5 °C se presentó un aumento progresivo en la concentración de fenoles por 6 d a 20 °C para al final disminuir. En jícama se reportó un incremento en la cantidad de fenoles totales por efecto del almacenamiento en frío, debido al incremento de la enzima fenilalanina amonio liasa (EC 4.3.1.5). El aumento en fenoles es continuo una vez transferidos a temperatura ambiente (Cantwell *et al.*, 2001). El análisis de varianza detectó diferencias entre los tratamientos a bajas temperaturas ( $P \leq 0.05$ ), después de 2 d a temperatura ambiente (Figura 1).

### Polifenol oxidasa

La actividad de PFO en los frutos testigo aumentó de 23.8 a 53.1 U g<sup>-1</sup> de la madurez fisiológica a la madurez de consumo (Figura 2), comportamiento que es similar al reportado por Alia *et al.* (2002). Varios reportes sugieren que la enzima se localiza exclusivamente en plastidios y se libera al citosol después de daños, senescencia o deterioro del órgano (Steffens *et al.*, 1994). En frutos de olivo (*Olea europea* L.) inmaduros se ha reportado que está unida fuertemente al cloroplasto; sin embargo, en frutos maduros la PFO es esencialmente soluble. Lo anterior demuestra que en esta última etapa las membranas de los cloroplastos se rompen y su estructura lamelar se desintegra, lo que facilita la liberación de la enzima (Marqués *et al.*, 1995). Los frutos de zapote mamey presentan un oscurecimiento gradual durante la maduración (Díaz *et al.*, 2000), oscurecimiento que puede ser enzimático atribuible a la oxidación de compuestos fenólicos por PFO en presencia de oxígeno (Amiot *et al.*, 1997). En papaya (*Carica papaya* L.) la actividad de PFO aumenta en la etapa de madurez de consumo, lo que puede explicar la desaparición del sabor amargo (astringente) en la pulpa del fruto (Pal y Selvaraj, 1987). En zapote mamey la disminución en astringencia durante la maduración probablemente se deba a la menor concentración de fenoles totales (Figura 1) y al aumento de PFO (Figura 2).

Durante el almacenamiento a 15 °C, la actividad de polifenol oxidasa disminuyó durante los primeros 10 d; posteriormente aumentó en forma continua hasta la salida a 20 °C y 6 d después alcanzó su máxima actividad (Figura 2). En los frutos almacenados a 5 y 10 °C, la actividad de polifenol oxidasa disminuyó durante el tiempo de almacenamiento de 20 d; una vez transferidos a 20 °C, la actividad aumentó continuamente en los frutos almacenados previamente a 10 °C hasta presentar un máximo 6 d después, para luego disminuir. Sin embargo, en los frutos

<sup>1</sup> Irán Alia Tejacal. Fisiólogo Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos

almacenados previamente a 5 °C la actividad de PFO se mantuvo baja y constante después de la refrigeración (Figura 2), por lo que la temperatura de 5 °C debió afectar la actividad de PFO. Según Cano *et al.* (1995), la maduración de frutos es fundamentalmente un proceso de diferenciación que involucra síntesis programada de enzimas específicas, y que en papaya indica síntesis de proteínas con actividades de POD y PFO que ocurren antes de la etapa

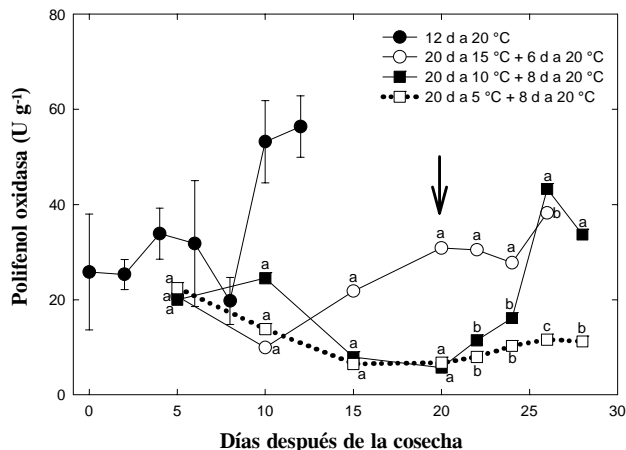


Figura 2. Actividad de polifenol oxidasa en frutos de zapote mamey almacenados a diferentes temperaturas. Cada punto indica la media de 4 observaciones ± error estándar (testigo). La flecha indica la transferencia a 20 °C. Medias con letras iguales entre los tratamientos a bajas temperaturas por día no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### Peroxidasa

En los frutos testigo la actividad de peroxidasa se mantuvo en aumento desde la madurez fisiológica ( $383 \text{ U g}^{-1}$ ) hasta la madurez de consumo ( $2104 \text{ U g}^{-1}$ ; Figura 3). Similarmente, Pérez *et al.* (1999) observaron en frutos de zapote mamey almacenados a 20 °C, que la actividad de peroxidasa aumenta durante la maduración. Esta inducción de la madurez de consumo y de inicio de senescencia probablemente se debe a la presencia de compuestos fenólicos libres factibles de reacción, ya que el aumento en la actividad de POD está relacionada con el incremento de la respiración durante el climaterio (Alia *et al.*, 2002). El aumento de la actividad de POD soluble se ha propuesto como un parámetro de maduración y senescencia en frutos de manzana (*Malus domestica* Borkh.) (Ingham *et al.*, 1998).

En frutos almacenados a 15 °C la actividad de peroxidasa aumentó continuamente, tendencia que se mantuvo una vez transferidos a 20 °C (Figura 3), comportamiento que es semejante al de los frutos testigo. Durante el almacenamiento a 5 y 10 °C la actividad de la enzima peroxi-

dasas se mantuvo baja y sin cambio, atribuible a una menor actividad por efecto del frío, ya que dicha actividad aumentó rápidamente después de la transferencia a 20 °C (Figura 3). Pérez *et al.* (1999) señalan que en frutos de zapote mamey la actividad de peroxidasa se inhibe por completo durante el almacenamiento a 2.5 °C y parcialmente a 10 °C, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente experimento. Zauberman *et al.* (1988) observaron que la actividad de POD en la cáscara de frutos de mango almacenados a 5 °C por 20 d alcanzó niveles mayores una vez transferidos a 20 °C, que en frutos almacenados constantemente a 20 °C. Los frutos de zapote mamey almacenados a 10 y 5 °C por 20 d y luego transferidos a temperatura ambiente sufrieron daños por frío (datos no mostrados), pero la actividad de POD fue similar a la de los frutos testigo (Figura 3). Este comportamiento que podría deberse a la termoestabilidad de POD (Robinson, 1991). En *Pisum sativum* L. la enzima no se desnaturizó durante el almacenamiento a temperaturas entre 5 y -40 °C (Gkinis y Fenneman, 1978).

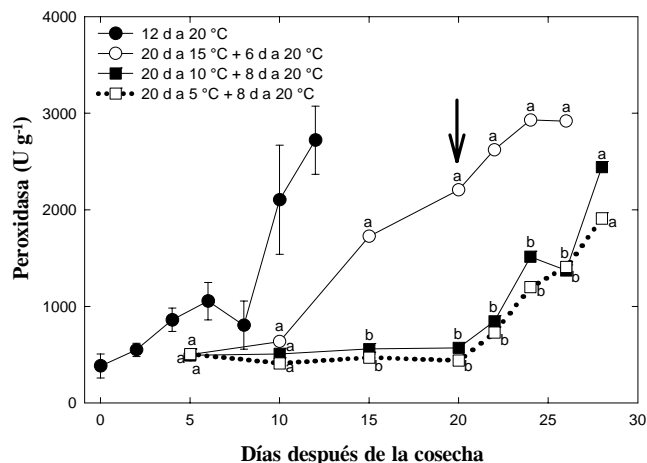


Figura 3. Actividad de peroxidasa en frutos de zapote mamey almacenados a diferentes temperaturas. Cada punto indica la media de 4 observaciones ± error estándar (testigo). La flecha vertical indica la transferencia a 20 °C. Medias con letras iguales entre los tratamientos a bajas temperaturas por día no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### Proteína soluble

En los frutos testigo se observó un incremento en proteína soluble; en la etapa de madurez fisiológica la concentración fue de  $82 \text{ mg kg}^{-1}$ , mientras que en madurez de consumo y senescencia fue 11 ( $950 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y 36 ( $2991 \text{ mg kg}^{-1}$ ) veces mayor (Figura 4). Ello probablemente se deba a que varios de los cambios y rutas metabólicas de la maduración involucran síntesis de proteínas (Tucker, 1993). Así, en frutos de manzana la síntesis de proteína aumenta durante la maduración y después de ésta (Lu *et al.*, 1992)

El zapote mamey posee entre 19 000 y 21 000 mg kg<sup>-1</sup> de proteína cruda (Hall *et al.*, 1980; Morton, 1987). La mayoría de los frutos comerciales contienen en promedio 8 000 mg kg<sup>-1</sup> de proteína cruda, dato que resulta particularmente importante para frutos de áreas tropicales donde el suministro de proteína no es suficiente para el crecimiento y mantenimiento de la salud humana (Hall *et al.*, 1980).

En los frutos almacenados a 5 y 15 °C la concentración de proteína soluble aumentó en 3 y 4 veces durante el almacenamiento, mientras que los frutos almacenados a 10 °C no se detectaron cambios en la concentración de proteína (Figura 4). Después de la transferencia a 20 °C, los frutos que fueron almacenados a 10 y 15 °C presentaron un comportamiento similar al de los frutos testigo (Figura 4), ya que la proteína soluble aumentó en esta fase de la maduración. Los frutos previamente almacenados a 5 °C mostraron una baja concentración de proteína soluble, seguida de un leve aumento que no fue suficiente para alcanzar los niveles de los otros tratamientos, lo que sugiere que la síntesis de proteína se inhibió por efecto del frío y del tiempo de almacenamiento.

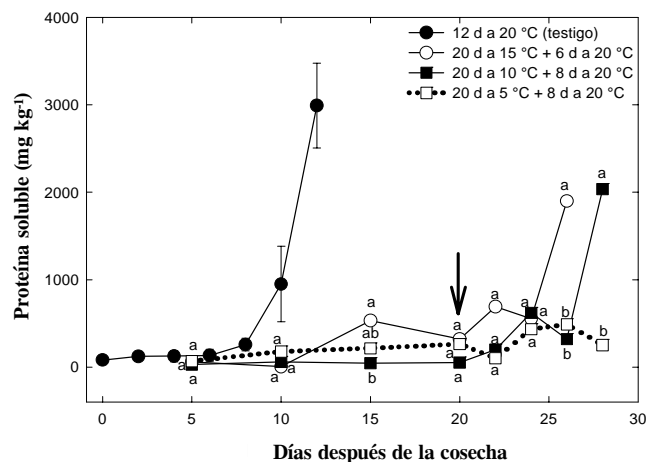


Figura 4. Comportamiento de la proteína soluble en frutos de zapote mamey almacenados a diferentes temperaturas. Cada punto indica la media de 4 observaciones ± error estándar (testigo). La flecha vertical indica la transferencia a 20 °C. Medias con letras iguales entre los tratamientos a bajas temperaturas por día no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

**Catalasa**

Durante la maduración la actividad de catalasa aumentó de 11.4 U g<sup>-1</sup> en la madurez fisiológica a 20.9 U g<sup>-1</sup> en la madurez de consumo (Figura 5), probablemente debido al aumento de respiración y otros procesos oxidativos. Aunque parecen similares los comportamientos de catalasa y la proteína soluble (Figura 4), la correlación es baja y no sig-

nificativa ( $r = 0.0486$  ns). En frutos de mango y papaya la actividad de catalasa también se incrementa considerablemente durante la maduración (Mitra y Baldwin, 1997; Pal y Selvaraj, 1987). Los análisis estadísticos detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). La actividad de catalasa aumentó durante el almacenamiento a 15 °C, ya que a la salida del almacenamiento tenía una actividad de 20.9 U g<sup>-1</sup>, y la máxima actividad (29.7 U g<sup>-1</sup>) la alcanzó 2 d después de la transferencia a 20 °C, para posteriormente disminuir. De la misma manera se comportaron los frutos almacenados previamente a 10 °C, pero con una actividad máxima menor; al salir del almacenamiento su actividad era de 12.7 U g<sup>-1</sup>, y una vez transferidos a 20 °C mostraron dos máximos a los 4 y 8 d, con 20.1 y 21.1 U g<sup>-1</sup>, respectivamente.

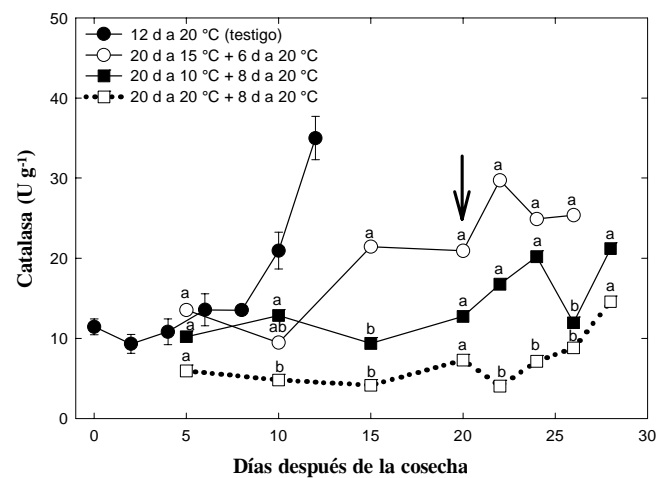


Figura 5. Actividad de catalasa en frutos de zapote mamey almacenados a diferentes temperaturas. Cada punto indica la media de 4 observaciones ± error estándar (testigo). La flecha vertical indica la transferencia a 20 °C. Medias con letras iguales entre los tratamientos a bajas temperaturas por día no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Los frutos almacenados a 5 °C mostraron una reducida actividad de catalasa (7.3 U g<sup>-1</sup>) durante el almacenamiento (Figura 5), y ese nivel se mantuvo constante hasta 6 d después de la transferencia a 20 °C; 2 d después aumentó un poco hasta 14.5 U g<sup>-1</sup>, lo que indica una posible inactivación de la enzima por el tiempo de exposición al frío o inhibición en la síntesis de proteína (MacRae y Ferguson, 1985). El presente experimento parece estar asociado a lo último, ya que los resultados presentan cierta relación ( $r = 0.40^{**}$ ) entre la concentración de proteína soluble y la actividad de la enzima en los frutos almacenados a bajas temperaturas (Figuras 4 y 5). Pero la inactivación no se puede descartar porque la catalasa es activa cuando la molécula precursora pasa a través de la membrana del peroxisoma a partir del citosol; una vez dentro del peroxisoma

adquiere grupos hemo y agregados para su activación. El daño a la membrana del peroxisoma puede afectar el ensamblado de catalasa, ya que un efecto del frío es la alteración de la membrana (MacRae y Ferguson, 1985). En este caso, el almacenamiento a 5 °C por 20 d pudo haber afectado el posterior comportamiento de la enzima a temperatura ambiente.

### Superóxido dismutasa

La actividad de SOD aumentó los primeros 4 d después de la cosecha, para después disminuir y finalmente aumentar en la madurez de consumo y senescencia (Figura 6). En *Amelincher alnifolia* Nutt. las actividades de SOD y CAT disminuyeron durante la maduración, lo cual puede contribuir a la acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno, e incrementar el estrés oxidativo (Rogiers *et al.*, 1998). Sin embargo, Du y Bramlage (1994) determinaron un incremento en la actividad de SOD durante la senescencia de los frutos de manzana, por lo que le proponen un papel de protección contra la senescencia asociada con radicales libres. En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) la actividad de SOD aumenta durante la sobremaduración, pero tal aumento no se correlacionó con cambios en la expresión genética de SOD. Por ello se ha sugerido realizar estudios de esta enzima a nivel subcelular para entender mejor la maduración (Jiménez *et al.*, 2002).

Durante el almacenamiento a bajas temperaturas la actividad de SOD fue constante; posterior a la transferencia a 20 °C la actividad de SOD en los frutos almacenados a 15 °C aumentó continuamente, mientras que en los frutos almacenados a 10 °C la actividad aumentó hasta 6 d después y en los frutos a 5 °C la actividad se mantuvo baja (Figura 6). Al igual que para catalasa, probablemente la temperatura y tiempo de almacenamiento afectaron la actividad de SOD después de la transferencia a 20 °C. Al comparar melones silvestres y cantaloupe Charentais modificados genéticamente (*Cucumis melo* var. cantalupensis Naud. 'vedratais' expresando el gen antisentido de ACC oxidasa) almacenados a 2 °C y posteriormente transferidos a 22 °C, el material silvestre presentó daños por frío y una menor actividad de SOD durante el almacenamiento; en contraste, los frutos genéticamente modificados no presentaron daño por frío y tuvieron mayor actividad de SOD en las mismas condiciones (Ben Amor *et al.*, 1999). El almacenamiento a 5 °C por 20 d causó daño por frío en frutos de zapote mamey, daños que pueden ser debidos en parte a las bajas actividades de SOD y CAT.

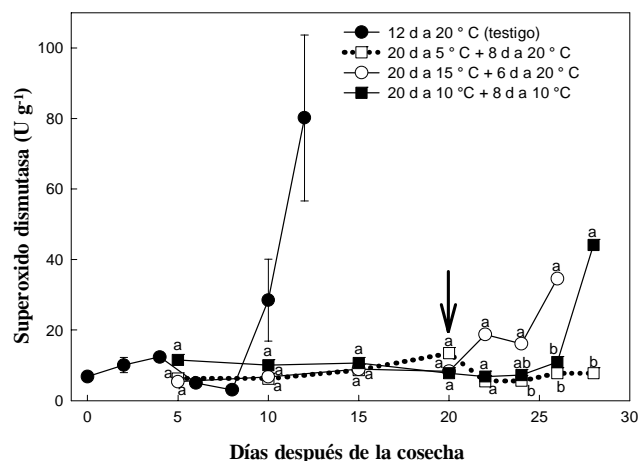


Figura 6. Actividad de peroxidasa en frutos de zapote mamey almacenados a diferentes temperaturas. Cada punto indica la media de 4 observaciones  $\pm$  error estándar (testigo). La flecha vertical indica la transferencia a 20 °C. Medias con letras iguales entre los tratamientos a bajas temperaturas por día no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

La maduración de los frutos de zapote mamey se caracteriza por disminución de fenoles totales, y por aumento en las actividades enzimáticas de polifenol oxidasa, peroxidasa, proteína soluble, catalasa y superóxido dismutasa. El almacenamiento a 15 °C no afectó los procesos bioquímicos relacionados con las variables evaluadas, pero el almacenamiento a 10 °C ya produjo efectos negativos. La síntesis de proteína y las actividades de polifenol oxidasa, catalasa y superóxido dismutasa fueron reducidas por el almacenamiento a 5 °C durante 20 d, lo que se atribuye a daños por frío.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del proyecto SEP-PROMEP (103.5/04/1359)

## BIBLIOGRAFÍA

- Alia T I, M T Colinas L, M T Martínez D, R M Soto H (2002) Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) en poscosecha. Rev. Chapingo S. Hortic. 8:263-281.
- Amiot M J, A Fleuriet, V Cheynier, J Nicolas (1997) Phenolic compounds and oxidative mechanism in fruit and vegetables. In: Phytochemistry of fruit and vegetables, F A Tomás Barberán, R J Robins (eds). Oxford University Press, USA. pp:51-85.
- Balerdi C F, P E Shaw (1998) Sapodilla, sapote and related fruit. In: Tropical and subtropical fruits. P E Shaw, H T Chan, S Nagy (eds). AGSCIENCE. USA. pp:78-136.

- Ben Amor M, B Flores, A Latché, M Bouzayen, J C Pech, F Romojaro (1999)** Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant Cell Environ.* 22:1579-1586.
- Beyer F W, I Fridovich (1987)** Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analyt. Biochem.* 161:559-566.
- Blackwell R D, A J S Murray, P J Lea (1990)** Enzymes of photorespiratory carbon pathway. *In: Methods in Plant Biochemistry.* P J Lea (ed). Academic Press. USA. pp:129-144.
- Bradford M M (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254.
- Cano M P, B Ancos, G Lobo (1995)** Peroxidase and polyphenoloxidase activities in papaya during postharvest ripening and after freezing/thawing. *J. Food Sci.* 60:815-817.
- Cantwell M I, G Peiser, E Mercado Silva (2001)** Induction of chilling injury in jicama (*Pachyrhizus erosus*) roots: changes in texture, color and phenolics. *Postharv. Biol. Technol.* 25:311-320.
- Díaz P J C, S Bautista, R Villanueva (2000)** Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. *Postharv. Biol. Technol.* 18:67-73.
- Du Z, W J Bramlage (1994)** Superoxide dismutase activities in senescing apple fruit (*Malus domestica* Borkh.) *J. Food Sci.* 59:581-584.
- Flurkey W H, J J Jen (1978)** Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.* 43:1828-1831.
- Giannopolities C N, S K Ries (1977)** Superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 59:309-314
- Gnikis A M, O R Fennema (1978)** Changes in soluble and bound peroxidases during low-temperature storage of green beans. *J. Food Sci.* 43:527- 531.
- Hall N T, J M Smoot, R J Knight, S Nagy (1980)** Protein and amino-acid compositions of ten tropical fruits by gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 28:1217-1221.
- Hammer E F (1993)** Oxidoreductases. *In: Enzymes in Food Processing,* T Nagodawhitana (ed). Academic Press. USA. pp:221-247
- Henríquez J M (1973)** Patrones de respiración de algunas frutas tropicales. *Proc. Tropical Region. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 17:167-175.
- Ingham L M, M L Parker, K W Waldron (1998)** Peroxidase: changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiol. Plant.* 93:93-100.
- Jiménez A, G Creissen, B Kular, J Firmin, S Robinson, M Verhoeyen, P Mullineux (2002)** Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 214:751-758.
- Lamikanra O (1995)** Enzymatic browning of Muscadine grapes products. *In: Enzymatic Browning and its Prevention.* C L Lee, J R Whitaker (eds). ACS. Washington, USA. pp:166-177.
- Lizada C (1993)** Mango. *In: Biochemistry of Fruit Ripening.* G B Seymour, J E Taylor, G A Tucker (eds). Chapman & Hall. London. pp:255-271.
- Lu G, H Liang, Z Lu (1992)** Metabolism of ribonucleic acid and protein in ripening apple fruits. *J. Plant Physiol.* 139:569-573.
- MacRae E A, I B Ferguson (1985)** Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. *Physiol. Plant.* 65:51-56.
- Marquès A L, A Fleuriet, J J Macheix (1995)** Fruit polyphenol oxidases: New data on an old problem. *In: Enzymatic Browning and its Prevention.* C L Lee, J R Whitaker (eds). ACS. Washington, USA. pp:90-104.
- Mitra S K, E A Baldwin (1997)** Mango. *In: Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits.* S K Mitra (ed). CAB International. Wallingford, U.K. pp:85 -122.
- Morton J F (1987)** Sapote. *In: Fruits of Warm Climates.* J F Morton (ed). Miami, Fl. USA. pp:398-402.
- Pal D K, Y Selvaraj (1987)** Biochemistry of papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening: changes in RNA, DNA, protein and enzymes of mitochondrial, carbohydrate, respiratory and phosphate metabolism. *J. Hort. Sci.* 62:117-124.
- Pérez T G O, I Vargas A, J C Díaz P, M A Téllez M (1999)** Actividad de polifenoloxidasa y peroxidasa en frutos de mamey sapote (*Pouteria sapota*). *Rev. Iberoam. Tecnol. Postcosecha* 1:120-125.
- Robinson D S (1991)** Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. *In: Food Enzymology.* Vol. 1. P F Fox. (ed). Elsevier, London. pp:399-426.
- Rogiers S Y, G N Mohan Kumar, N R Knowles (1998)** Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Ann. Bot.* 81:203-211.
- Saucedo V C, A R Martínez M, S H Chávez F, R M Soto H (2001)** Maduración de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn tratados con etileno. *Rev. Fitotec. Mex.* 24:231-234.
- Sala J M (1998)** Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 13:255-261.
- Salveit M E, L E Morris (1990)** Overview on chilling injury of horticultural crops. *In: Chilling injury of horticultural crops.* C Y Wang (ed). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp:3-15.
- Shewfelt R L, B A del Rosario (2000)** The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortScience* 35:575- 579
- Stauffer C E (1989)** Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostrand Reinhold. USA. 317 p.
- Steffens J C, E H, M D Hunt (1994)** Polyphenol oxidase. *In: Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism,* B E Ellis (ed). Plenum Press. New York, USA. pp:275-312
- Tomás Barberán F A, J C Espín (2001)** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81:853-876.
- Tucker G A (1993)** Introduction. *In: Biochemistry of Fruit Ripening.* G B Seymour, J E Taylor, G A Tucker (eds). Chapman & Hall. London. pp:1-55.
- Van Buren J (1970)** Fruit phenolics. *In: The Biochemistry of Fruits and their Products* A C Hulme (ed). Academic Press. Kent, Great Britain. pp:269-304.
- Van de Velde F, F Rantwijk, R A Sheldon (2001)** Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotech.* 19:73-80.
- Walker J R L (1995)** Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. *In: Enzymatic Browning and its Prevention.* C L Lee, J R Whitaker (eds). ACS. Washington, D.C. USA. pp:8-22.
- Wang C Y (1995)** Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharv. Biol. Technol.* 5:67-76.
- Waterman P G, S. Mole (1994)** Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 238 p.
- Zauberman G, Y Fuchs, I R, A Wexler (1988)** Chilling injury, peroxidase and cellulose activities in the peel of mango fruit at low temperature. *HortScience* 23:732-733.