



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Parámetros indicadores de inducción y
protección al daño por frío (DPF) en frutos de
limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.).

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA
M en C. Fernando Rivera Cabrera.

Comité Tutorial:

Co-tutora: Dra. Laura Josefina Pérez Flores.

Co-tutora: Dra. Clara Pelayo Zaldívar.

Asesor: Dr. Manuel A. Castillo Rivera.

Asesor: Dr. David M. Díaz Pontones.

México D.F. 13 de Junio 2005

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. <i>Origen y clasificación taxonómica del limón.....</i>	4
2.2. <i>Características generales del limón.....</i>	4
2.2.1 <i>Morfología del limón.....</i>	4
2.2.2 <i>Composición del fruto</i>	6
2.3. <i>Importancia de la producción del limón en México</i>	7
2.4 <i>Almacenamiento en refrigeración</i>	8
2.5. <i>Daño por frío.....</i>	9
2.5.1. <i>Síntomas del DPF</i>	9
2.6. <i>Metabolitos fermentativos.....</i>	10
2.7. <i>Compuestos volátiles.....</i>	11
2.8. <i>Especies reactivas de oxígeno (EROS) en las plantas.....</i>	12
2.8.1. <i>Reacciones biológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS)....</i>	12
2.9. <i>Daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación).....</i>	13
2.10. <i>Sistemas antioxidantes</i>	15
2.10.1 <i>Superóxido dismutasa.....</i>	17
2.10.2. <i>Peroxidasa (PX)</i>	18
2.11. <i>Tratamientos de acondicionamiento</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. <i>Objetivo general.....</i>	22
4.2. <i>Objetivos particulares</i>	22
5. HIPÓTESIS	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. <i>Material biológico y tratamientos</i>	25
6.1.1. <i>Variables</i>	26
6.1.2. <i>Diseño experimental y análisis de los resultados</i>	26

6.1.3. Análisis estadístico	26
6.2. Metodología	27
6.2.1. Evaluación del color	27
6.2.2. Evaluación de pérdida fisiológica de peso.....	27
6.2.3. Evaluación de los síntomas de daño por frío	27
6.2.4. Metabolitos fermentativos	28
6.2.5. Determinación de compuestos aromáticos	28
6.2.6. Ensayo de lipoperoxidación	29
6.3. Extracción de las enzimas	29
6.3.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	29
6.3.2. Peroxidasa (PX).....	30
6.4. Determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática.....	30
6.4.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	30
6.4.2. Peroxidasa (PX).....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1. Color	32
7.2. Pérdida fisiológica de peso.	36
7.3. Metabolitos fermentativos (acetaldehído y etanol)	38
7.4. Compuestos aromáticos	41
7.5. Efecto del tratamiento de acondicionamiento (13°C por 48h) en el daño por frío y los niveles de lipoperoxidación en limón 'Mexicano'	42
7.6. Efecto del tratamiento de acondicionamiento (13°C por 48h) en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (PX) en limón 'Mexicano'	45
7.7. Efecto del tratamiento de acondicionamiento (53°C por 3min) en la actividad enzimática de la peroxidasa (PX), superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de lipoperoxidación en limón Persa (<i>Citrus latifolia</i> T).	49
8. DISCUSION.....	54
9. CONCLUSIONES.....	60
10. BIBLIOGRAFÍA.....	61

1. INTRODUCCIÓN

El almacenamiento de productos hortofrutícolas a bajas temperaturas es ampliamente usado para extender su vida postcosecha. Sin embargo, cuando los frutos subtropicales como el limón 'Mexicano (*Citrus aurantifolia* S.) se almacenan por debajo de temperaturas críticas, se induce un desorden fisiológico conocido como daño por frío (DPF) (Osorio-Mora y Zacarías, 2000, Balandran-Quintana y col., 2003).

Aunque este desorden disminuye la aceptación del consumidor y puede resultar en pérdidas comerciales, no tiene ningún efecto sobre la calidad interna del fruto (Sala, 1998). Los síntomas típicos de daño del DPF en cítricos son entre otros la aparición de manchas en el flavedo (cáscara), el oscurecimiento del albedo (capa blanca por debajo de la cáscara) (Sala y Lafuente, 1999).

Las células vegetales producen especies reactivas de oxígeno (EROS) como parte de su metabolismo, sin embargo también poseen mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos contra las EROS, tales como la superóxido dismutasa, la peroxidasa, y la catalasa, antioxidantes liposolubles (α -tocoferol y β -caroteno) y antioxidantes hidrosolubles (ácido ascórbico y glutatión) (Noctor y Foyer, 1998; Mitler, 2002; Toivonen, 2004; Purvis, 2004; Sundar, y col., 2004; Zkiewicz, y col., 2004). Estos mecanismos presentes en las plantas son usualmente suficientes para protegerlas del daño oxidativo durante el periodo de crecimiento y bajo condiciones de estrés moderado (Kang y Salveit, 2001; Toivonen, 2004; Purvis, 2004).

Algunos autores han sugerido la participación del estrés oxidativo en el desarrollo del DPF (Wise y Naylor, 1987; Sala, 1998; Kang y Salveit, 2001; Rivero y col., 2002). Se sugiere que un incremento en los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en plantas puede ser la razón para tolerar o reducir la severidad del estrés oxidativo causado por diferentes tipos de estrés abióticos (Zhang y col., 2004; Elkahoui, y col., 2005; Sinha, y col., 2005; Tester y Bacic, 2005). En cítricos, Sala

(1998) reportó que los cultivares tolerantes al daño por frío tienen un sistema antioxidante más eficiente que los cultivares sensibles. De esta manera la supresión de las EROS puede estar involucrada en la tolerancia al DPF (Foyer y col., 1997; Lacan y Baccou, 1998).

Recientemente se ha demostrado la efectividad de diferentes tratamientos con calor en la resistencia al DPF en cítricos (Porat y col., 2000; Schirra y col., 2000; Holland y col., 2002; Fallik, 2004).

Por otra parte, acondicionamientos con temperaturas por encima de las temperaturas críticas inductoras de DPF también han sido usadas para reducir los síntomas de DPF en cítricos (Huock y col., 1990; Biolatto y col., 2005). En otras especies: pimientos dulces, calabacín squash y en plántulas de pepino se han reportado resultados similares (McColloch, 1962; Kramer y Wang, 1989; Erez y col., 2002).

Los datos arriba mencionados muestran que acondicionamientos prealmacenaje con altas y bajas temperaturas pueden reducir el desorden fisiológico inducido por temperaturas inductoras de DPF en diferentes especies incluyendo cítricos (Huock y col., 1990; Rodov y col., 1995; Porat y col., 2000; Fallik, 2004; Biolatto y col., 2005).

La tolerancia que confieren las temperaturas de prealmacenaje puede estar relacionada con un incremento en el sistema antioxidante, que podría prevenir la acumulación de EROS (Prasad, 1996). Sala (1998) reportó un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en frutos de mandarina 'Fortuna' acondicionados con calor (37°C por 3 días) previo a su almacenamiento en frío. Posteriormente, se reportó que la inducción de estas enzimas se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento en refrigeración (Sala y Lafuente, 1999).

En resultados preliminares, de nuestro grupo reportamos que el acondicionamiento con calor húmedo (53°C por 3 min) en limón Persa (*Citrus latifolia* T.) produjo un

incremento significativo, pero transitorio en la actividad de las enzimas antioxidantes inmediatamente después del tratamiento. Sin embargo, esta inducción no se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento y no se observó una reducción significativa del DPF (Rivera, 2001). Estos resultados sugieren que la efectividad del acondicionamiento depende de que la inducción de las enzimas antioxidantes se mantenga durante todo el periodo de almacenamiento (Rivera y col., 2004).

En este trabajo también se evaluó, mediante la determinación de distintos parámetros indicadores del estrés oxidativo (metabolitos fermentativos, compuestos aromáticos y lipoperoxidación), el posible efecto protector del acondicionamiento a 13 °C por 48h en frutos de limón 'Mexicano' almacenados en distintas temperaturas de refrigeración.

2. ANTECEDENTES

2.1. Origen y clasificación taxonómica del limón

México se ha colocado durante los últimos cinco años como el principal productor de limón a nivel mundial. Sin embargo, el limón no es originario de nuestro país y tampoco de nuestro continente. El limón 'Mexicano', limón verde o lima agria, cuya denominación científica es la de *Citrus aurantifolia* S. es originario de Asia (posiblemente del Archipiélago de India), desde donde fue transportado a Egipto, Europa y posteriormente a América (Eckert y Eask, 1989; Dussel, 2002). Con la colonización española, el limón llegó a nuestro país para ocupar un lugar importante en la citricultura nacional. El nombre "Citrus" se ha usado para denominar diversos y diferentes frutos en el pasado. Sin embargo, existe mucha confusión sobre la clasificación de estos frutos debido a que poseen muchas similitudes. Se ha sugerido que son seis los géneros que integran el grupo de los cítricos verdaderos: *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* y *Clymania*. Todos estos géneros se caracterizan por tener frutos con una pulpa jugosa, compuesta por numerosas vesículas que rellenan todo el espacio en los segmentos del fruto no ocupados por las semillas. De estos seis géneros sólo tres son los que tienen importancia comercial: *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*. Estos géneros pertenecen a la familia de las Rutáceas (Ting y Attaway, 1971). Por otra parte, las limas son clasificadas en la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Sapindales, Familia Rutaceae. El limón 'Mexicano' se ubica dentro de las limas ácidas, junto con el limón Persa (*Citrus Latifolia* T.) y el limón verdadero (*Citrus limón*) (Dussel, 2002).

2.2. Características generales del limón

2.2.1 Morfología del limón

Todos los frutos de los cítricos presentan la mismas estructuras anatómicas: flavedo, albedo y carpelos, aunque los elementos que componen estas estructuras varían de acuerdo a la especie y la variedad (Loussert, 1992). El flavedo (cáscara) esta constituido de tejidos morfológicamente diferentes. El tejido más externo es la

epidermis, la cual es una capa de células poligonales isodiamétricas que cubren la superficie entera del fruto (Ting y Attaway, 1971). Las paredes celulares exteriores de esta capa se encuentran cutinizadas y en parte cubiertas con una sustancia cerosa. Estas paredes cutinizadas, al igual que la cera previenen las pérdidas excesivas de agua del fruto. Directamente debajo de la epidermis se encuentran capas de células de colénquima y parénquima. A diferentes profundidades del tejido parenquimatoso se localizan numerosas células de forma obloide y/o esférica que contienen glándulas oleíferas, de las cuales se extraen los aceites esenciales (Wardowski y col., 1986). Bajo las capas de células de colénquima y parénquima, se encuentra un tejido blanco de textura esponjosa, denominado albedo. La porción comestible del fruto está constituida por un conjunto de carpelos o segmentos, separados por paredes carpelares (Ting y Attaway, 1971). Dentro de los carpelos se desarrollan muchas vesículas de jugo. En general, el número de los carpelos varía; en el caso de los limones se presentan de 8 a 11 segmentos (Loussert, 1992).

Los frutos del limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.) son de forma redonda-oval de colores que van del verde oscuro brillante al amarillo, alcanzando tamaños que no sobrepasan los 6.5 cm y tiene abundantes semillas, además de su jugo ácido y un alto contenido de aceite esencial en la cáscara (Davies y Albrigo, 1994).

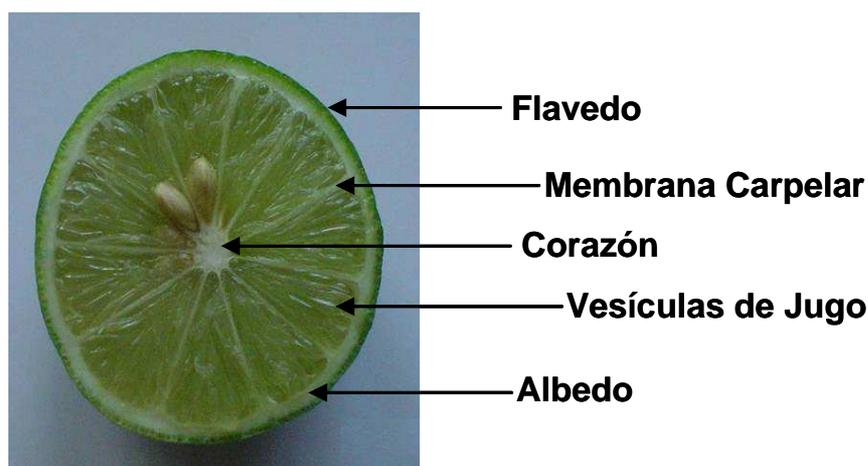


Figura 1. Anatomía del limón 'Mexicano'.

2.2.2 Composición del fruto

Como se mencionó anteriormente, el flavedo es rico en glándulas oleíferas de las cuales se extraen los aceites esenciales (principalmente d-limoneno), también contiene pigmentos (principalmente clorofilas y carotenos) (Ting y Attaway, 1971).

El albedo generalmente es rico en celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pécticas y compuestos fenólicos. Los carpelos tienen más o menos los mismos constituyentes químicos que el albedo. La mayoría de los azúcares y casi todo el ácido cítrico del fruto se encuentran en el jugo que poseen las vesículas, el jugo también contiene compuestos nitrogenados, lípidos, compuestos fenólicos, vitaminas y diversas sustancias inorgánicas (Loussert, 1992).

El limón al igual que todos los cítricos son frutos no climatéricos, por lo que no presentan un proceso de maduración de consumo después de la cosecha (Wills y col, 2002). Generalmente el fruto alcanza su madurez fisiológica y casi de consumo en el árbol, de esta manera, la pulpa llega a ser jugosa y ácida (o dulce como en el caso de naranjas, toronjas, mandarinas, etc.) (Wardowski y col., 1986).

En términos generales, el limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.) presenta diferencias en composición química respecto al limón Persa (*Citrus latifolia* T.). Algunas de estas diferencias son presentar mayor acidez, alto contenido de aceite esencial, mejor calidad de este aceite y menor cantidad de vitamina C (Dussel, 2002).

2.3. Importancia de la producción del limón en México

La comercialización de productos hortofrutícolas frescos, así como la de sus productos derivados procesados, representan una fuente importante de divisas para los países de clima tropical y subtropical, entre los cuales se encuentra México.

La producción mundial de limón en el 2004 fue de 12,126,233 toneladas, de las que México aportó 1,824 800 toneladas, colocándose así como el principal productor de limón a nivel mundial (FAOSTAT Database 2004).

A nivel nacional, el limón ocupa dentro de los cítricos el segundo lugar en importancia, tanto por su consumo en fresco como por su uso en la industria (Dussel, 2002).

Actualmente el limón se ubica dentro de las principales frutas producidas en nuestro país. En el cuadro 1 se presentan los principales países productores de limón en el periodo de 2000-2004 (FAOSTAT Database, 2004).

Cuadro 1. Principales productores de limón y limas ácidas (10^3 t) a nivel mundial.

PAIS PRODUCTOR	2000	2001	2002	2003	2004
EUA	762	903.5	726.6	930,770	939
España	915	1,037.2	919.7	1,061,200	1,070.6
Irán	1,032.4	1,038.8	1,040	1,040,000	1,040
Argentina	1,171.4	1,180	1,200	1,200,000	1,236.2
India	1,400	1,320	1,370	1,370,000	1,420
México	1,661.2	1,594	1,680.3	1,694,030	1,824.8

*Datos tomados de FAOSTAT Database 2004.

En nuestro país las dos principales variedades de limón que se cultivan son: el 'Mexicano' (*Cítrus aurantifolia*) que aporta el 70% de la producción nacional y el Persa (*Cítrus latifolia*) que contribuye con el 30% restante. Ambas variedades están bien diferenciadas por zonas productoras, tipos de tierras (riego o temporal), esquemas de comercialización. El limón 'Mexicano' se cultiva fundamentalmente en la costa del Pacífico siendo Colima el principal estado productor, y el limón Persa en la costa del Golfo (Claridades Agropecuarias, 2002).

El limón 'Mexicano' generalmente se consume en fresco aunque también se emplea para la obtención de jugos concentrados, aceites esenciales y pectinas. Debido a la

preferencia de los consumidores se le destina principalmente al abastecimiento del mercado nacional (Dussel, 2002), exhibiendo exportaciones marginales menores al 4 % de la producción (Claridades Agropecuarias, 2002).

Con respecto a su manejo postcosecha, es necesario optimizar las diferentes operaciones a las que se somete en las empacadoras, con el fin de mejorar los procesos de acondicionamiento y conservar la calidad del fruto.

2.4 Almacenamiento en refrigeración

Las tecnologías de conservación postcosecha buscan retardar la maduración y senescencia, con el fin de prolongar el tiempo de vida útil de los productos y conservar su calidad. La refrigeración es una de las tecnologías más difundidas para la conservación de frutas y hortalizas. Su amplia utilización se debe a que permite conservar el valor nutritivo, sabor natural, olor y calidad de los productos almacenados resultando éstos semejantes a los recién cosechados. Asimismo, esta práctica de conservación permite, en muchos casos, un mayor margen de tiempo para su transporte. La baja temperatura puede disminuir sustancialmente la velocidad de muchos procesos metabólicos (respiración, producción de etileno, maduración y senescencia), además de proteger al fruto del ataque de patógenos que conducen al deterioro y a la pérdida de la calidad (Kitinoja y Kader, 2003). Sin embargo, para ciertos productos, sobre todo los de origen tropical y subtropical, este tipo de práctica de conservación presenta algunos problemas, debido a la susceptibilidad que presentan estos productos a las bajas temperaturas.

El objetivo perseguido por el almacenamiento en refrigeración es el de restringir la velocidad de deterioro, sin acarrear una maduración anómala u otros cambios perjudiciales, manteniendo así el producto durante periodos tan largos como sea posible en condiciones aceptables para el consumo. No existe una temperatura ideal para el almacenamiento de todas las frutas y hortalizas, dado que son distintas sus respuestas a las bajas temperaturas. La temperatura adecuada para cada especie y

variedad se establece tomando en cuenta tanto factores climáticos y labores culturales durante el desarrollo, como el crecimiento de hongos, la susceptibilidad al daño por frío, así como la duración del periodo de conservación deseado durante el almacenamiento (Kitinoja y Kader, 2003).

2.5. Daño por frío

En particular, los productos hortofrutícolas de origen tropical o subtropical, como el limón mexicano, resultan en mayor o menor grado, sensibles a las bajas temperaturas y presentan daños cuando son sometidos a estas condiciones (Osorio-Mora y Zacarías, 2000; Balandran-Quintana y col., 2003). La sensibilidad a las bajas temperaturas que caracteriza a estos productos puede derivar en una fisiopatía compleja conocida como daño por frío (DPF), la severidad del daño está relacionada con la especie, el cultivar de que se trate, las condiciones precosecha y poscosecha, las temperaturas, y los períodos de almacenamiento, entre otros factores.

2.5.1. Síntomas del DPF

Cuando los frutos subtropicales como el limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.) se almacenan por debajo de ciertas temperaturas críticas, se induce la fisiopatía denominada daño por frío (Osorio-Mora y Zacarías, 2000; Balandran-Quintana y col., 2003). En el caso de los cítricos los síntomas más evidentes del DPF son: la aparición de manchas en el flavedo, el oscurecimiento del albedo y en casos severos la producción de sabores y olores desagradables (Sala y Lafuente, 1999). Generalmente, los síntomas de DPF no se manifiestan sino hasta que los frutos son retirados del almacenamiento en refrigeración y son colocados a temperatura ambiente (Gross y col., 2002).

2.6. Metabolitos fermentativos

En diversos frutos el desarrollo de sabores y olores no deseados puede ser el resultado de la acumulación de metabolitos fermentativos relacionados con la respiración anaeróbica (Larsen y Watkins, 1995; Forney y col., 2000; Imahori, y col., 2003; Zhang y Watkins, 2005).

El aroma y sabor característico de los cítricos es una mezcla compleja de compuestos volátiles que incluyen alcoholes, aldehídos, terpenos, ésteres, cetonas y óxidos (Bruemmer, 1986). Dentro de la larga lista de alcoholes presentes en los cítricos, el etanol es el principal constituyente orgánico en el perfil aromático. Los ésteres y aldehídos son considerados de los grupos que más contribuyen en el aroma de las frutas. El butirato de etilo y el acetaldehído son importantes componentes volátiles que proporcionan una alta calidad al jugo de naranja (Nagy, 1996). El etanol está enzimáticamente relacionado con el butirato de etilo y el acetaldehído a través de reacciones catalizadas por la enzima alcohol acil transferasa (AAT) y la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) respectivamente. El etanol y el acetaldehído se incrementan durante la maduración de las frutas, cuando la acidez disminuye, los sólidos totales incrementan y los compuestos del sabor y el aroma alcanzan los valores característicos de la madurez de consumo (Bruemmer, 1986).

Por otra parte el etanol, el acetaldehído y otros ésteres etílicos son productos de la respiración anaeróbica. Diferentes autores han reportado un incremento en los niveles de etanol, acetaldehído y otros ésteres etílicos en diferentes frutos almacenados en atmósferas bajas en oxígeno y altas en concentraciones de bióxido de carbono (Golias y Bottcher, 2002; Imahori, y col., 2003; Lara, y col., 2003; Pelayo, y col., 2003), así como también, como resultado de la aplicación de tratamientos de acondicionamiento que incluyen bajas y altas temperaturas en cítricos (Biolatto, y col., 2005; Zhang y Watkins, 2005).

De acuerdo con Purvis (1997), el metabolismo fermentativo de las frutas es estimulado por condiciones de estrés externas (temperaturas inductoras de daño por frío) e internas (estrés oxidativo). El aumento en los metabolitos fermentativos (acetaldehído, etanol y acetato de etilo) puede tener un impacto negativo en el sabor, si sus concentraciones rebasan los valores umbral de percepción sensorial (Ke y col., 1991). Sin embargo, antes de que esto ocurra, el incrementó en la producción de

etanol estimula la síntesis de ésteres etílicos y limita la de otros ésteres (Ke y col., 1994), planteándose la hipótesis de que es el desbalance en los componentes aromáticos y no el incremento de metabolitos fermentativos lo que primero altera la percepción del sabor (Pelayo, 2001). De acuerdo a lo anterior, la alteración del perfil aromático de ésteres podría ser, por lo tanto, un mejor y más temprano indicador de estrés oxidativo que los niveles aumentados de acetaldehído, etanol y acetato de etilo u otros cambios como la lipoperoxidación de membranas o cambios fisiológicos como los patrones anormales de transpiración, respiración y producción de etileno, o bien el excesivo ablandamiento de la fruta y la susceptibilidad a infecciones.

2.7. Compuestos volátiles

Las alteraciones en el sabor y aroma inducidos por el DPF, también pueden deberse a modificaciones en la composición y/o distribución de algunos de los compuestos aromáticos presentes en los aceites esenciales o en la pulpa del limón. Al respecto, Obenland y colaboradores (1997) encontraron que la cantidad de limoneno emanado de frutos con DPF es mucho mayor que la de frutos no dañados. Biolatto, y colaboradores (2005) reportaron niveles más bajos de d-limoneno en frutos de toronja acondicionados (13°C por 7 días + 2°C por 18 días de tratamiento cuarentenario previo a su almacenamiento a 13°C) que en frutos no acondicionados. Sin embargo, no queda claro si la acumulación y liberación de limoneno es agente causal o consecuencia del DPF.

2.8. Especies reactivas de oxígeno (EROS) en las plantas

Las plantas, al igual que cualquier organismo aerobio, utilizan la naturaleza reactiva del oxígeno, para obtener la mayor energía de los nutrientes reducidos que son oxidados hasta CO₂ y H₂O durante el proceso de la respiración. Sin embargo, durante este proceso catabólico y en otros procesos metabólicos como la fotosíntesis se producen especies reactivas de oxígeno (EROS), entre las que se encuentran el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido e hidroxilo. Estas moléculas por su

alta reactividad pueden actuar sobre diversos componentes celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) alterando su función (Mittler, 2002).

2.8.1. Reacciones biológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS)

Las reacciones de oxígeno activado con substratos orgánicos son complejas en condiciones *in vitro* con soluciones homogéneas. En los sistemas biológicos son aún más complejas debido a las propiedades de las membranas, a las cargas eléctricas, a las propiedades de unión de las macromoléculas y a la compartimentalización de las enzimas y los substratos. Así, los diferentes compartimientos de una misma célula difieren en la naturaleza y magnitud de las reacciones con EROS.

Los mecanismos por los cuales los radicales de oxígeno dañan a los lípidos de la membrana están bien aceptados y consecuentemente, el daño oxidativo es a menudo asociado casi exclusivamente con las reacciones de peroxidación en los lípidos de membrana. Sin embargo, las investigaciones realizadas sobre el efecto del estrés ambiental en plantas revelan que las formas activadas del oxígeno atacan asimismo, proteínas y ácidos nucleicos, reacciones que también pueden ser letales (Mittler, 2002).

2.9. Daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación)

El incremento en el estrés oxidativo a nivel celular ha cobrado gran importancia como uno de los eventos predominantes en la senescencia vegetal y en las respuestas de las plantas a distintos tipos de estrés (bióticos o abióticos).

La principal manifestación molecular de este incremento en el estrés oxidativo es la peroxidación de los lípidos de membrana, que se ha propuesto como punto de confluencia de varias fisiopatías y diversos tipos de estrés (Shewfelt y del Rosario, 2000; Elkahoui, y col., 2005; Sinha, y col., 2005). El deterioro de los lípidos llevaría a la pérdida de la integridad y fluidez membranal, que a su vez afectaría la función apropiada de las proteínas de membrana ya sea por un ataque directo de las EROS

o por la pérdida de actividad debida a un ambiente lipídico desfavorable. Aunque los lípidos, las proteínas y el ADN son susceptibles al ataque por radicales libres, se ha observado que la peroxidación de lípidos esta cinéticamente favorecida (Shewfelt y Purvis, 1995; Kratsch y Wise, 2000).

De esta manera, la peroxidación preferencial de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas tiene una función protectora al prevenir el ataque a las proteínas y al ADN (Shewfelt y Purvis, 1995; Shewfelt y del Rosario, 2000).

Todas las EROS son extremadamente reactivas y citotóxicas en todos los organismos. Estas especies pueden causar la peroxidación de la membrana en el plasmalema o en las membranas de los organelos intracelulares. El daño causado conduce a la pérdida de la compartimentalización celular, fuga o pérdida del contenido celular, a una rápida desecación y a la muerte celular en casos extremos (Mittler, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno tales como el superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son productos que se originan del transporte de electrones en los cloroplastos y mitocondrias entre otros procesos metabólicos (Dat y col., 2000). La interacción del superóxido y el peróxido de hidrógeno con especies de hierro (Fe^{2+}) en las membranas conduce a la formación de radicales libres de lípidos presumiblemente vía la formación del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Borg y Snaich, 1998).

Por otra parte, el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el cual se forma en los cloroplastos durante la fotosíntesis, es también una molécula altamente reactiva que ataca a los lípidos (Mittler, 2002).

La lipoperoxidación es una consecuencia natural de los procesos metabólicos en la célula, que ocurre tanto en plantas como en animales. Involucra reacciones de iniciación, propagación, y terminación, la formación y propagación de radicales de

lípidos, el consumo de oxígeno, un rearrreglo de los dobles enlaces de los lípidos insaturados y la eventual destrucción de los lípidos de la membrana, produciendo una gran variedad de productos de degradación, incluyendo alcoholes, cetonas, aldehídos y otros (Snaich, 1992; Mittler, 2002). La peroxidación únicamente del ácido linoleico, da como resultado la formación de por lo menos veinte productos de degradación. Las membranas biológicas son frecuentemente ricas en ácidos grasos insaturados y están inmersas en un fluido que contiene metales y además es rico en oxígeno. Por lo tanto, no es sorprendente que los lípidos de membrana sean muy susceptibles al ataque peroxidativo.

El mecanismo de la lipoperoxidación se ilustra en la figura 2. Inicia con la remoción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado (1), lo que da por resultado la formación del radical lípidico (2). El rearrreglo de las dobles ligaduras produce dienos conjugados (3). El ataque por oxígeno molecular produce un radical peroxidílico (4), el cual puede remover un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un hidroperóxido lipídico (5), o un endoperóxido lipídico (6) que a su vez conduce generalmente a la formación de malondialdehído (MDA) como producto de degradación (7) (Buege y Aust, 1978). La medición o cuantificación del malondialdehído (MDA), se ha usado como un indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha usado como un parámetro indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer, y *col.*, 1991).

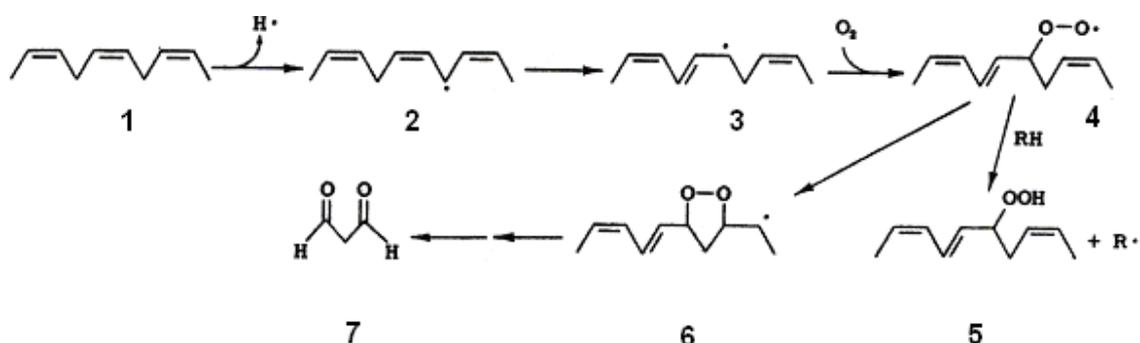


Figura 2. Diagrama general de la lipoperoxidación de las cadenas de ácidos grasos (tomado de Buege y Aust, 1978).

2.10. Sistemas antioxidantes

Las células vegetales poseen mecanismos de protección contra los efectos de las EROS (Fig. 3). Estos sistemas antioxidantes incluyen mecanismos de detoxificación enzimáticos tales como la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), la peroxidasa (PX total, no específica), y la catalasa (CAT EC 1.11.1.6), etc. y no enzimáticos dentro de los cuales se pueden mencionar a los antioxidantes liposolubles (α -tocoferol y β -caroteno) y antioxidantes hidrosolubles (ácido ascórbico y glutatión) (Noctor y Foyer, 1998; Mittler, 2002; Sundar, y col., 2004; Zkiewicz, y col., 2004).

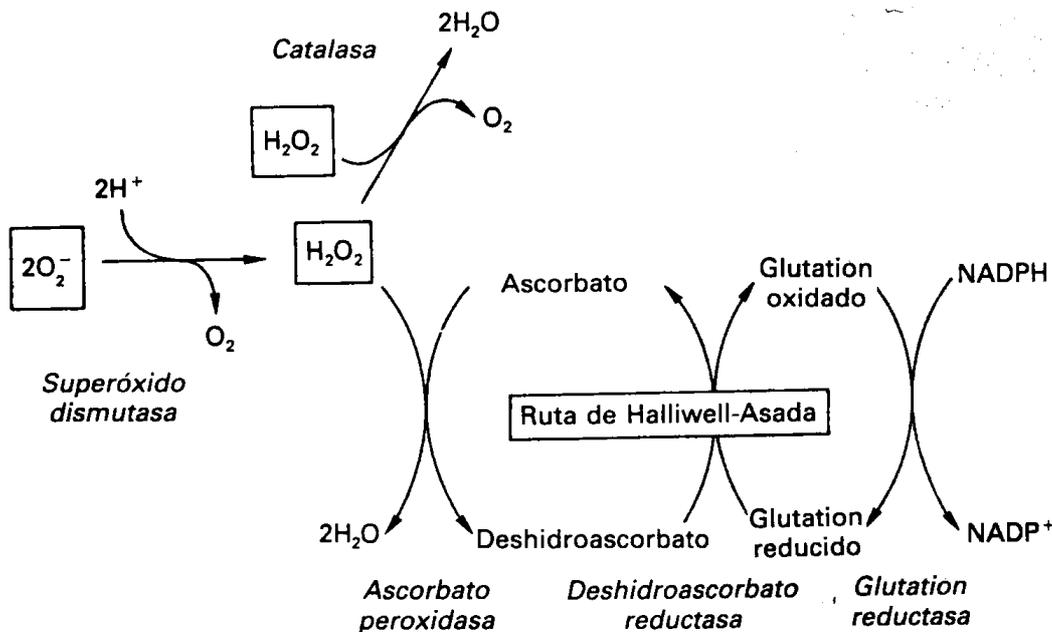


Figura 3. Mecanismo enzimático de protección al estrés oxidativo en cloroplasto, mitocondría y citoplasma (tomado de Azcon-Bieto y Talon, 1993).

En condiciones normales, estos mecanismos son suficientes para contrarrestar el efecto de las EROS y disminuir sus efectos (peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, etc.) (Bohnert y Sheveleva, 1998; Kang y Salveit, 2001; Mittler, 2002). Sin embargo, durante la senescencia y en presencia de estrés biótico o abiótico, en la

planta ocurre un desbalance en los mecanismos de protección, aumentando el estrés oxidativo a nivel celular, lo que ocasiona entre otros efectos, la pérdida de la integridad membranal por lipoperoxidación (Sala, 1998; Shewfelt y del Rosario, 2000). Por lo tanto, un mecanismo antioxidante más eficiente es determinante en la protección frente al estrés oxidativo (Sala, 1998; Elkahoui, y col., 2005; Sinha, y col., 2005).

2.10.1 Superóxido dismutasa

Las enzimas superóxido dismutasas juegan un papel central en el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo (Fig.4). Estas enzimas están presentes en todos los organismos aerobios y en la mayoría de los compartimientos celulares que generan EROS. Esta enzima, dismuta el radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, impidiendo así que este radical sirva como precursor del radical hidroxilo que tiene una vida media mayor (Bowler y col., 1992; Mittler, 2002).



Figura 4. Dismutación del radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2), catalizada por la superóxido dismutasa (SOD).

Existen tres diferentes tipos de SODs clasificadas con base en su cofactor. Las isoenzimas dependientes de cobre-zinc (SOD-Cu/Zn), las dependientes de manganeso (SOD-Mn) y las dependientes de hierro (SOD-Fe) (Bowler y col., 1992; Polle, 2001). Estas isoenzimas pueden ser separadas por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y su actividad puede ser detectada mediante tinción. Las isoenzimas antes mencionadas se detectan por su sensibilidad diferencial a los inhibidores cianuro de potasio (KCN) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La superóxido dismutasa dependiente de manganeso es resistente a ambos inhibidores, mientras

que la dependiente de cobre zinc es sensible a ambos; y la superóxido dismutasa dependiente de hierro es resistente a KCN y sensible a H_2O_2 . Su distribución celular también las distingue, la SOD-Mn se localiza en la mitocondria de células eucariontes, algunas isoenzimas SOD-Cu/Zn se encuentran en el citosol y otras en los cloroplastos de plantas superiores. Las isoenzimas SOD-Fe se han detectado pocas veces en plantas, pero cuando se detectan se encuentran asociadas a cloroplasto (Polle, 2001).

2.10.2. Peroxidasa (PX)

Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino animal y vegetal, y se han encontrado en todas las plantas superiores que han sido investigadas (Fig. 5). En general estas enzimas son hemoproteínas de aproximadamente 300 aminoácidos que usan el peróxido de hidrógeno como sustrato oxidativo; aunque se han encontrado otras peroxidasas que contienen otros grupos metálicos, tales como selenio, vanadio o un grupo prostético de flavina (Christensen y col., 1998).

Las peroxidasas tienen un grado alto de versatilidad y participan en un gran número de reacciones separadas. Las peroxidasas son capaces de catalizar reacciones peroxidativas, oxidativas e hidroxilaciones (Kermasha y Metche, 1988).

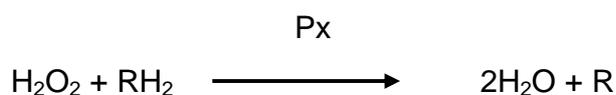


Figura 5. Reacción de óxido-reducción del peróxido de hidrógeno catalizado por peroxidasas, donde RH_2 corresponde a diferentes sustratos reducidos (glutación, ascorbato, etc.).

Las peroxidasas forman parte de un grupo de enzimas llamadas oxido-reductasas. Existen grupos de isoenzimas de peroxidasas que pueden ser separadas y

detectadas por medio de electroforesis. Se ha demostrado que estas isoenzimas son codificadas por genes estructurales separados localizados en cromosomas diferentes. Las isoperoxidasas parecen estar localizadas en todas las estructuras y organelos de la célula (Yoshimura y col., 2000).

Las peroxidases se localizan principalmente en citoplasma, vacuolas y pared celular; aunque también se han detectado en tonoplasto, plasmalema, mitocondria y microsomas (Robinson, 1991).

Las peroxidases se han implicado en muchos procesos metabólicos tales como el catabolismo de hormonas, la oxidación de fenoles, el entrecruzamiento de los polisacáridos y las proteínas estructurales de la pared celular, la polimerización de la lignina, la maduración de frutas y la defensa contra patógenos (Christensen y col., 1998).

Durante la maduración de los frutos y particularmente durante el climaterio, se ha encontrado que la actividad de peroxidases se incrementa junto con la actividad de otras enzimas, tales como la poligalacturonasa y las celulasas, las cuales están normalmente asociadas con el proceso de maduración (Robinson, 1991).

2.11. Tratamientos de acondicionamiento

Recientemente se ha demostrado la efectividad de diferentes tratamientos con altas temperaturas en la resistencia al DPF en cítricos. Un tratamiento de acondicionamiento a 60°C por 30 seg en frutos de toronja 'Ruby Star' y 3 días de acondicionamiento a 37°C en frutos de mandarinas 'Fortuna' disminuyeron el daño por frío. (Porat y col., 2000; Schirra y col., 2000; Holland y col., 2002)

Por otra parte, los acondicionamientos con temperaturas superiores de las temperaturas críticas (inductoras de DPF), también se han usado para reducir los síntomas de DPF en cítricos. Los limones acondicionados a 5°C ó 15°C por una

semana antes del tratamiento cuarentenario (0 -2.2°C por 10-22 días) mostraron menos daño por frío que aquellos frutos no acondicionados (Huock y col., 1990). Se han reportados resultados similares en otras especies. Los pimientos dulces acondicionados a 10°C por 5 ó 10 días antes de su almacenamiento a 0°C manifestaron menos DPF (McColloch, 1962). También, el mantener calabacines squash a 10°C ó 15°C por dos días, retrasó la aparición de los síntomas de DPF durante el almacenamiento de los frutos a 2.5°C ó 5°C (Kramer y Wang, 1989) y la aclimatación con frío de plántulas de pepino a 12°C por 48 h produjo tolerancia al DPF a 2°C (Erez y col., 2002).

Los datos antes mencionados muestran que la aplicación de tratamientos de acondicionamiento con altas y bajas temperaturas durante prealmacenamiento pueden disminuir el desorden fisiológico inducido por temperaturas críticas de DPF en diferentes especies incluyendo a los cítricos (Huock y col., 1990; Rodov y col., 1995; Porat y col., 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

Nuestro país ocupa el primer lugar como productor de limón a nivel mundial (FAOSTAT Database, 2004). A nivel nacional, el limón ocupa el segundo lugar en importancia entre los cítricos después de la naranja (Dussel, 2002). Sin embargo, para prolongar el tiempo de vida útil, conservar su calidad y evitar pérdidas, es necesario profundizar en el uso de tecnologías postcosecha que nos permitan optimizar los procesos de manejo del producto, con el fin de generar recomendaciones.

Este proyecto se realizó con el fin de generar conocimientos respecto a los mecanismos bioquímicos del DPF, a través de la determinación de indicadores tempranos del daño y de la regulación de los sistemas antioxidantes por el acondicionamiento. Por otra parte, el conocimiento adquirido permite generar recomendaciones respecto a las condiciones óptimas de refrigeración en las que se pueden conservar estos frutos, extendiendo al máximo su vida útil sin inducir DPF, así como determinar la efectividad del tratamiento de acondicionamiento en la protección del DPF.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de las bases bioquímicas del daño por frío y de los tratamientos protectores del DPF en limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S) y limón Persa (*Citrus latifolia* T).

4.2. Objetivos particulares

1. Determinar las variables fisiológicas color, pérdida fisiológica de peso y daño por frío en frutos de limón 'Mexicano' con o sin acondicionamiento y almacenados a distintas temperaturas.
2. Evaluar la inducción de DPF mediante la determinación de parámetros indicadores de estrés oxidativo (metabolitos fermentativos, compuestos aromáticos y lipoperoxidación) en frutos de limón 'Mexicano' almacenados en diferentes temperaturas de refrigeración.
3. Determinar la participación de algunos mecanismos enzimáticos de defensa de EROS (SOD y PX) en la tolerancia al daño por frío en frutos de limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S).
4. Evaluar el efecto protector contra el DPF del acondicionamiento a 13°C por 48h en frutos de limón 'Mexicano' almacenado en distintas temperaturas de refrigeración.
5. Determinar la participación de algunos mecanismos enzimáticos de defensa de EROS (SOD y PX) en la tolerancia al daño por frío en frutos de limón Persa (*Citrus latifolia* T).
6. Determinar los niveles de lipoperoxidación como parámetro indicador de estrés oxidativo en frutos de limón Persa almacenados en diferentes temperaturas de refrigeración.
7. Realizar una comparación de los mecanismos antioxidantes (SOD y PX), los niveles de lipoperoxidación y la efectividad de los tratamientos aplicados contra el DPF en limón 'Mexicano' y limón Persa.

5. HIPÓTESIS

1. Inducción sostenida de enzimas antioxidantes

La aplicación del tratamiento de acondicionamiento prealmacenaje (13°C por 48h) en limón 'Mexicano' podría inducir un incremento en el sistema enzimático antioxidante y mantener esta inducción hasta el final del periodo de almacenamiento, previniendo así la acumulación de EROS provocando un efecto protector contra el DPF.

2. Metabolitos Fermentativos

El metabolismo fermentativo se estimulará por diversas condiciones de estrés, favoreciendo la acumulación de acetaldehído, etanol y acetato de etilo.

3. Otros Ésteres Etilícos

Antes que ocurra la acumulación de metabolitos fermentativos, el etanol puede disiparse a través de la síntesis de diversos ésteres etílicos. Se propone que el incremento en el nivel de estos compuestos podría ser un mejor indicador de estrés oxidativo que la acumulación de metabolitos fermentativos.

4. Otros Compuestos Aromáticos

Probablemente otros compuestos aromáticos del limón, presentes en el aceite esencial o en la pulpa, puedan ser indicadores de estrés oxidativo e informativos de los caminos metabólicos que están siendo alterados bajo condiciones de estrés.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Material biológico y tratamientos*

Los frutos de limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.) fueron cosechados en Tecomán, Colima, el área de producción más importante en México para esta especie, y transportados a la ciudad de México a temperatura ambiente. Durante el segundo día después de la cosecha los frutos fueron clasificados para eliminar todos aquellos frutos dañados y obtener muestras uniformes en color, tamaño, y calidad (verde oscuro con un diámetro de 3.4-3.9 cm y libres de defectos), se separaron dos lotes de 855 frutos cada uno. Un lote fue acondicionado en una cámara a $13 \pm 1^\circ\text{C}$ y 85% de humedad relativa durante 48 h, previo a su almacenamiento. Los dos lotes de frutos se subdividieron aleatoriamente en grupos de 270 limones que fueron almacenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $10 \pm 1^\circ\text{C}$ y $4 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad relativa de $90 \pm 2\%$.

Con base a una tabla de números aleatorios se tomaron muestras de 15 limones por triplicado a los 3, 6, 9, 12, 16 y 20 días de almacenamiento a las diferentes temperaturas, así como muestras iniciales del mismo tamaño antes y después del acondicionamiento. Se separó el flavedo y el jugo de cada muestra, ambos se congelaron con nitrógeno líquido y el flavedo se pulverizó previo a su almacenamiento. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Los frutos de limón Persa (*Citrus latifolia* S.) fueron cosechados en Martínez de la Torre, Veracruz, México, los frutos fueron clasificados para eliminar todos aquellos frutos dañados y obtener muestras uniformes en color, tamaño, y calidad (verde oscuro con un diámetro de 53-62 mm y libres de defectos). Los frutos seleccionados se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de 640 frutos. El primer grupo fue subdividido en cuatro grupos de 160 limones y almacenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $13 \pm 1^\circ\text{C}$, $8 \pm 1^\circ\text{C}$ and $4 \pm 1^\circ\text{C}$, y 80% HR. El segundo grupo fue acondicionado a 53°C por 3 min y subdividido aleatoriamente en cuatro grupos y almacenados a las mismas temperaturas. El análisis inicial (cero días de almacenamiento) se llevó acabo en tres

repeticiones de 15 limones antes del acondicionamiento. Se tomaron muestras de 15 limones por triplicado a los 3, 6, 9, 12, 15, 20 y 25 días de almacenamiento para cada una de las temperaturas. Se separó el flavedo de cada muestra, se congeló, y pulverizó previo a su almacenamiento. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

6.1.1. Variables

Se tomaron muestras representativas de flavedo y/o jugo de limón previamente conservados a -70°C , para efectuar cada uno de los siguientes ensayos: superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (PX), lipoperoxidación, metabolitos fermentativos (etanol y acetaldehído) y compuestos aromáticos. Por otra parte, también se determinaron las variables fisiológicas de color, pérdida fisiológica de peso (PFP) y daño por frío (DPF) en frutos enteros antes de la congelación del flavedo y el jugo.

6.1.2. Diseño experimental y análisis de los resultados

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y los tratamientos que se aplicaron fueron de acuerdo a un diseño factorial con tres réplicas de 15 limones por tratamiento. La unidad experimental fue la mezcla homogénea del flavedo y jugo de 15 limones, o los 15 frutos enteros dependiendo de la variable medida.

6.1.3. Análisis estadístico

Se utilizó el programa NCSS (2001, Jerry Hintze) para realizar el análisis de varianza (ANOVA, de acuerdo a un diseño complemente al azar) y la prueba comparación multiples de medias de Tuckey. En ambos casos el nivel de significancia estadística fue de $\alpha=0.05$.

6.2. Metodología

6.2.1. Evaluación del color

El color se determinó utilizando un colorímetro ColorFlex 45/0 (HunterLab, 114 Sunset Hills Road, Reston , V. A. 20190) en muestras de 15 limones por triplicado de cada uno de los tratamientos en las diferentes fechas de muestreo previamente mencionadas.

6.2.2. Evaluación de pérdida fisiológica de peso

Para la evaluación de pérdida fisiológica de peso se seleccionó un lote de 90 frutos que a su vez se subdividió aleatoriamente en 6 repeticiones de 15 frutos cada una, en ambos tratamientos y para cada una de las temperaturas utilizadas. Se registraron los cambios de peso en repeticiones de 15 frutos en los periodos establecidos utilizando una balanza analítica OHAUS EXPLORER de precisión 4100x 0.01 g. Estos frutos permanecieron en cada una de las temperaturas durante todo el almacenamiento. La pérdida fisiológica de peso se reportó como porcentaje de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ PFP} = 100 \times (1 - \text{Pa}/\text{Pi})$$

Donde:

%PFP = Porcentaje de pérdida fisiológica de peso

Pa = Peso promedio de los frutos a lo largo del almacenamiento

Pi = Peso promedio inicial de los frutos

6.2.3. Evaluación de los síntomas de daño por frío

El daño por frío se midió por triplicado en muestras de 15 limones después de mantenerlas tres días a 25°C (simulación de vida de anaquel) en cada uno de los tratamientos. La incidencia y severidad de los síntomas de daño por frío se evaluó midiendo el área afectada de cada limón en papel celofán, para su cuantificación el área se transfirió a papel milimétrico, obteniéndose así el área daño por frío en cm².

6.2.4. Metabolitos fermentativos

5 mL de jugo se mezclaron con 2 g de NaCl en un vial, se selló y se incubó durante 15 min a 25°C, se agitó durante 30 seg en un vortex . Se tomó una muestra de 1 mL de la mezcla gaseosa del espacio de cabeza y se inyectó a un cromatógrafo de gases Hewlet Packard 5890 serie II con las siguientes condiciones para separar acetaldehído y etanol (Pelayo, 2001).

Condiciones cromatográficas

Columna empacada: Carbowax al 5% sobre carbopack 60/80

Gas acarreador: N₂, flujo 20 mL/min

Temperatura del inyector: 115°C

Temperatura del detector: 200°C

Programa de temperatura: Temperatura inicial de 80°C, tiempo de corrida 0 min

Tasa de cambio de 10°C/min hasta 130°C, tiempo de corrida 6 min.

6.2.5. Determinación de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos se determinaron utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en ingles Solid Phase Microextraction). Se tomaron 3 ml de jugo de limón y 2 g de cloruro de sodio (NaCl), se colocaron en un vial, el cual se selló y se agitó durante 30 seg. Se adsorbieron los compuestos volátiles del espacio de cabeza durante 20 min utilizando una fibra SPME de polidimetil siloxano de 100µm de espesor y se desorbieron durante 2 min a 200°C en el puerto de inyección de un cromatógrafo acoplado a un detector de masas (CG-Masas.) (cromatógrafo Hewlett Packard 5890 serie II plus, detector de masas Hewlett Packard 5972), bajo las siguientes condiciones cromatográficas (Pelayo, 2001).

Condiciones de operación del CG-MS

Columna capilar: DB-Waxetr (60 m X 0.32 mm diámetro interno, 1 µm de espesor fase estacionaria, J&W Scientific, Folsom, CA).

Gas acarreador: He, flujo 3 mL/min.

Temperatura del inyector: 200°C.

Programa de temperatura: Temperatura inicial de 50°C, tiempo de corrida 1 min.

Tasa de cambio de 5°C/min hasta 110°C por 0 min.

Tasa de cambio de 20°C/min hasta 180°C por 10 min.

Tiempo de corrida: 26.5 min.

Detector de Masas: alcance de la exploración de 40 a 300 m/z.

6.2.6. Ensayo de lipoperoxidación

Se pesaron 0.5 g de flavedo y se homogeneizaron con 5 ml de amortiguador de Tris 20 mM, pH=7.4, a 4°C; el homogenado se centrifugó a 19,000 g por 15 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante para la determinación de los niveles de lipoperoxidación por medio de un ensayo comercial (Bioxytech LPO-586, Oxis) que se basa en la cuantificación de malondialdehído (MDA) producto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas (Buege y Aust, 1978). El ensayo de LPO-586 está basado en la reacción del MDA con un agente cromógeno, el N-metil-2-fenilindol (R1), catalizada por HCl. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de R1, para dar un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm.

6.3. Extracción de las enzimas

6.3.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Se pesaron 0.5 g de flavedo de limón y se homogeneizaron con 5 mL de amortiguador de extracción (K_2HPO_4) 100 mM, a pH=7, ascorbato de sodio 10 mM y ácido dietilen triamino penta acético (DTPA) 5 mM a 4°C y 30 mg de polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP)]. El homogenado se centrifugó a 16,000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante que contiene la enzima, se desaló utilizando un ultrafiltro para centrífuga Ultrafree-15 de Millipore, a 6500 g durante 40 min 4°C. El volumen retenido se llevó a un volumen final de 1 mL con un amortiguador de fosfato

de potasio (K_2HPO_4) 50 mM conteniendo 200 μ M de DTPA y se tomó como la fuente inicial de enzimas (Beyer y Fridovich, 1987).

6.3.2. Peroxidasa (PX)

Se pesaron 0.5 g. de flavedo de limón y se homogeneizaron con 5 ml de amortiguador de K_2HPO_4 , 100mM a pH 6.8, a 4°C. El homogenado se centrifugó a 17,000 g por 15 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante como fuente inicial de la enzima (Kar y Mishra, 1976).

6.4. Determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática

6.4.1. Superóxido dismutasa (SOD)

El ensayo de SOD se llevó a cabo por el método modificado de nitro azul de tetrazolio (NBT) descrito por Beyer y Fridovich (1987). El ensayo se basa en la competencia por los radicales superóxido fotogenerados, entre el colorante NBT (el cual es oxidado por los radicales superóxido a un coloide púrpura fino que absorbe a 560 nm y es estable en suspensión por la presencia de un detergente) y la SOD presente en la muestra (que usa como sustrato a los radicales superóxido). El volumen total de la reacción fue de 1mL y contenía 10-50 μ L de muestra, a la cual se le adicionó 0.025% Triton X-100 y 57 μ mol de NBT, ajustando el volumen para el ensayo de SOD con un amortiguador de fosfato de potasio (K_2HPO_4) 50 mM conteniendo 200 μ M de DTPA .

La reacción se inició por la adición de metionina a una concentración final de 0.01 M y riboflavina a una concentración final de 1.13 μ M (sistema de fotogeneración del radical superóxido). Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron a una distancia de 15 cm de un tubo fluorescente de 30 W por 30 min. El desarrollo de la coloración púrpura se determinó por mediciones de la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro (Beckman Serie DU-250), contra un blanco del amortiguador utilizado para el ensayo de SOD. Se construyó una curva de inhibición de la A_{560} nm contra un volumen creciente de la muestra. Una unidad de SOD se define como la

cantidad de enzima contenida en un volumen del extracto que causa un 50% de inhibición en la reducción del NBT.

6.4.2. Peroxidasa (PX)

La actividad de la peroxidasa se determinó de acuerdo a Kar y Mishra (1976). La mezcla de reacción contenía: 125 μL de amortiguador de K_2HPO_4 , 100mM pH 6.8, 50 μmoles de pirogallol, 50 μmoles de H_2O_2 y 1 ml del extracto de la enzima (diluída 1:20). La mezcla de reacción se incubó por 1 minuto a 25° C. La reacción se detuvo con la adición de 0.5 mL de H_2SO_4 al 5% (v/v). La cantidad de purpurogalina se determinó por la medición de la absorbancia a 420nm. Una unidad de peroxidasa se define como la cantidad de enzima que causa un incremento de 0.1 unidades de absorbancia a 420 nm.

7. RESULTADOS

7.1. Color

En los frutos sin acondicionar el parámetro de brillantez (L^*) se observó una tendencia a disminuir en los primeros nueve días de almacenamiento y los frutos alcanzaron su máximo valor en a los 12 días en todas las temperaturas de almacenamiento, para posteriormente disminuir hacia el final del periodo de almacenaje (Fig. 6). Los frutos acondicionados exhibieron menor brillantez inmediatamente después del acondicionamiento (Fig. 9), aunque estos valores fueron mayores a tiempos posteriores (3, 6 y 9 días) en todas las temperaturas de almacenamiento en comparación a los valores mostrados por lo frutos sin acondicionar (Fig. 6 y Fig. 9), hacia el final del almacenamiento la tendencia fue similar a la observada en los frutos sin acondicionar.

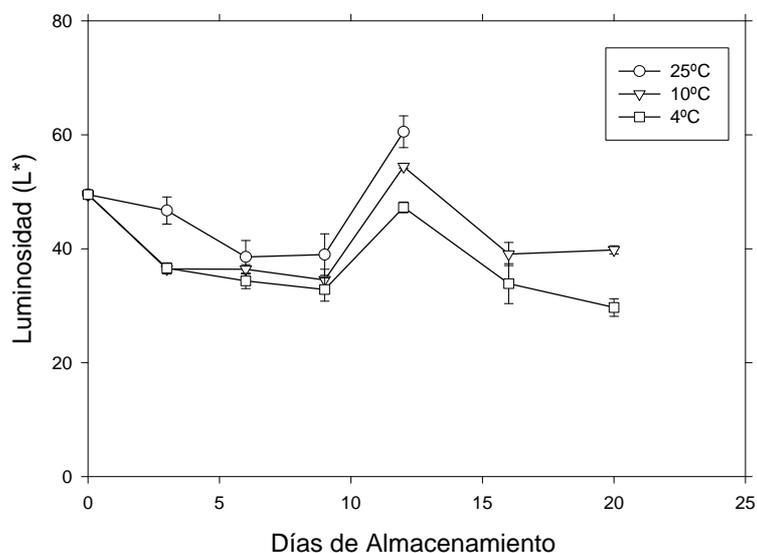


Figura 6. Luminosidad en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Los cambios en el color del flavedo fueron de un verde oscuro brillante ($C^*=37.9$ y $h^*=107.3$) a un amarillo profundo ($C^*=50$ y $h^*=102.7$) en los frutos sin acondicionar almacenados a 25°C y a un verde alimonado brillante ($C^*=36.8$ y $h^*=100.2$) en los

frutos sin acondicionar almacenados en temperaturas de refrigeración (Fig. 7, 8, 10 y 11). Se observaron diferencias significativas en los valores de cromaticidad (C^*) en los frutos sin acondicionar almacenados a 25°C los cuales fueron mayores a los observados en los frutos almacenados en refrigeración durante todo el periodo de almacenamiento ($p < 0.05$), en cambio no existieron diferencias significativas en los frutos sin acondicionar y almacenados en refrigeración durante los primeros nueve días (4 y 10°C) ($p > 0.05$) (Fig. 7).

Los valores iniciales de cromaticidad en los frutos acondicionados fueron menores inmediatamente después del tratamiento a los observados en los frutos sin acondicionar (Fig. 7 y 10), incrementándose posteriormente (los 9 primeros días) y superando los valores observados en los frutos sin acondicionar (excepto a los 6 días donde existió una pronunciada disminución), para finalmente disminuir hacia el final del almacenamiento (Fig. 10).

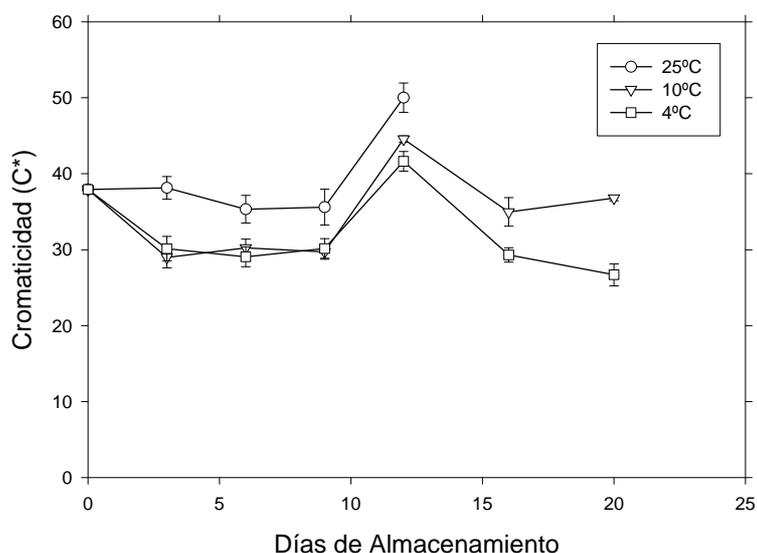


Figura 7. Cromaticidad en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

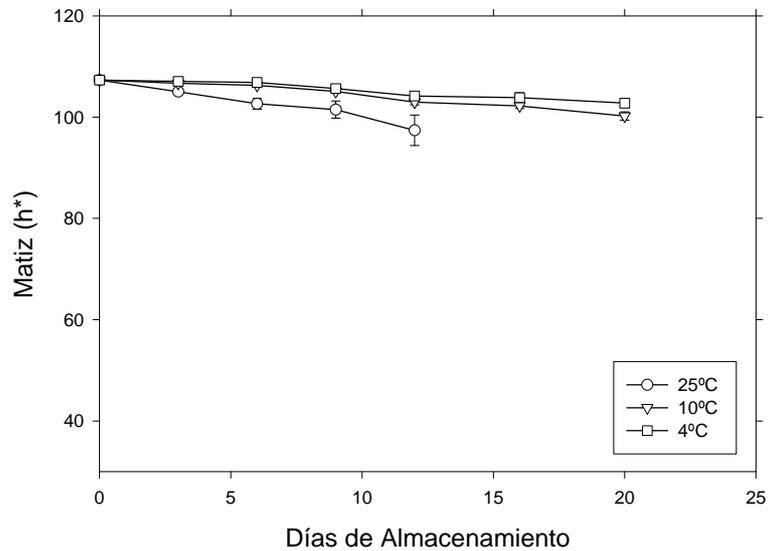


Figura 8. Matiz en frutos de limón ‘Mexicano’ sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Los valores del parámetro de color matiz (h^*) disminuyeron en todas las temperaturas de almacenamiento, en menor grado en los frutos almacenados en temperaturas de refrigeración, esta tendencia y los valores observados fueron similares en frutos con y sin acondicionamiento no observándose diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p>0.05$) (Fig. 8 y 11).

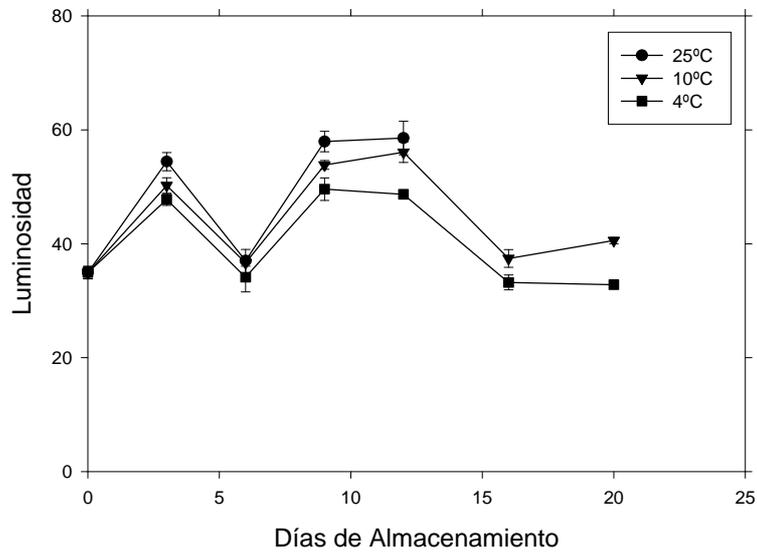


Figura 9. Luminosidad en frutos de limón 'Mexicano' acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

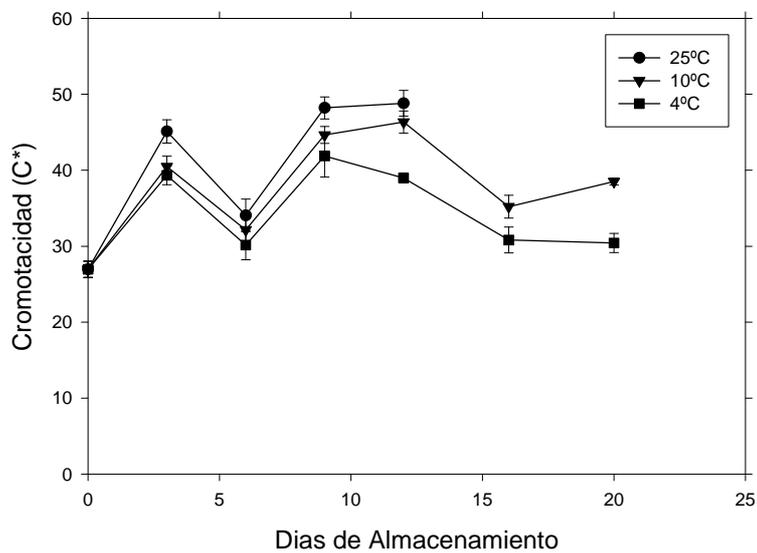


Figura 10. Cromaticidad en frutos de limón 'Mexicano' acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

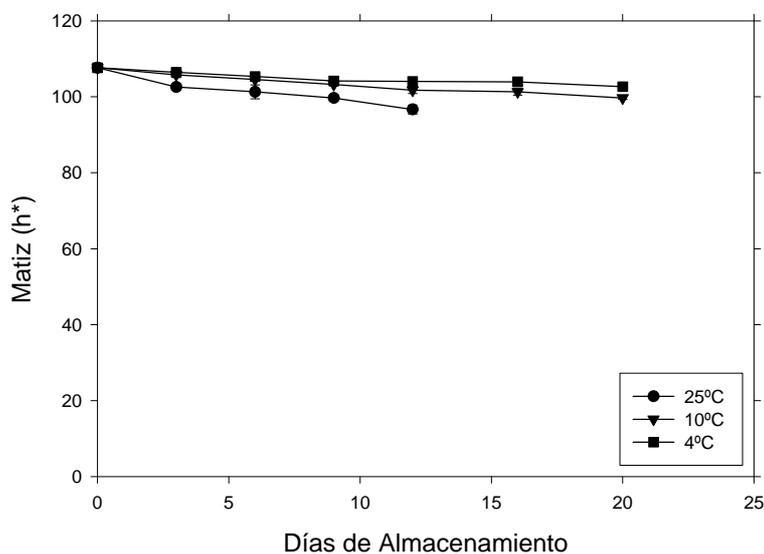


Figura 11. Matiz en frutos de limón 'Mexicano' acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

7.2. Pérdida fisiológica de peso.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la pérdida fisiológica de peso entre los frutos sin acondicionar y acondicionados en todas las temperaturas de almacenamiento estudiadas (Fig. 12, y 13). Los frutos sin acondicionar, almacenados a 25, 10 y 4°C perdieron menos de peso en promedio 1.470%, 0.968% y 0.966% por día con respecto a aquellos que recibieron el acondicionamiento durante todo el periodo de almacenamiento (Fig. 12, y 13).

En los frutos sin acondicionar el mayor porcentaje de pérdida de peso se observó en los frutos almacenados a temperatura ambiente (25°C), seguido por los limones almacenados a 4°C y finalmente los que menos peso perdieron fueron los limones almacenados a 10°C (Fig. 12). Una tendencia similar fue observada en los limones acondicionados (Fig. 13).

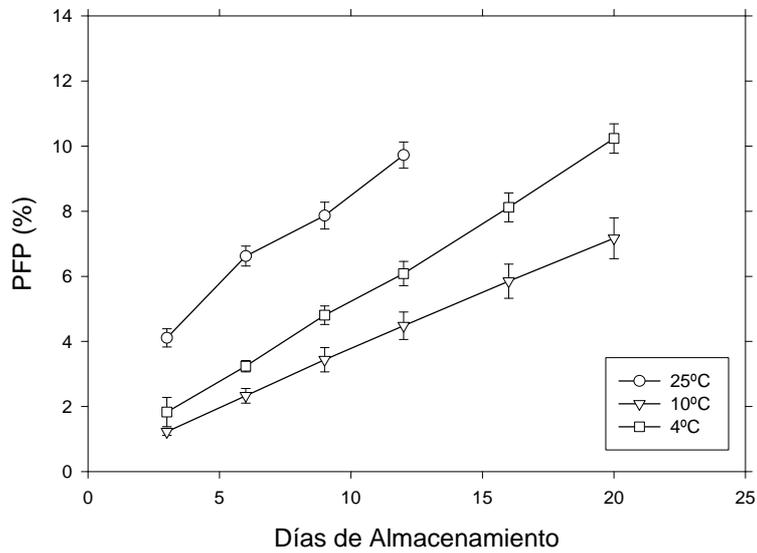


Figura 12. Pérdida fisiológica de peso (PFP) en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados en distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

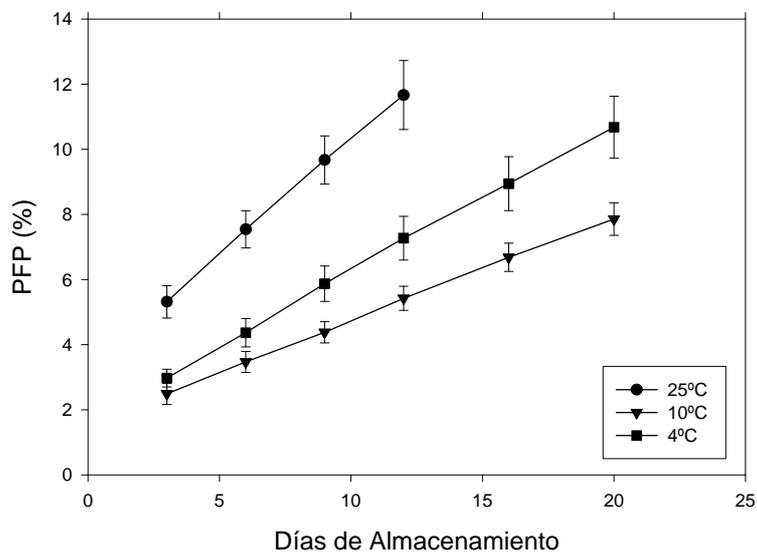


Figura 13. Pérdida fisiológica de peso en frutos de limón 'Mexicano' acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

7.3. Metabolitos fermentativos (acetaldehído y etanol)

En general, no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en los niveles de acetaldehído en los frutos con y sin acondicionamiento durante los primeros 12 días en ninguna de las temperaturas de almacenamiento utilizadas. Sin embargo, se presentó un incremento importante después de los 15 días en los frutos almacenados a 4°C en ambos tratamientos (Fig. 14 y 16).

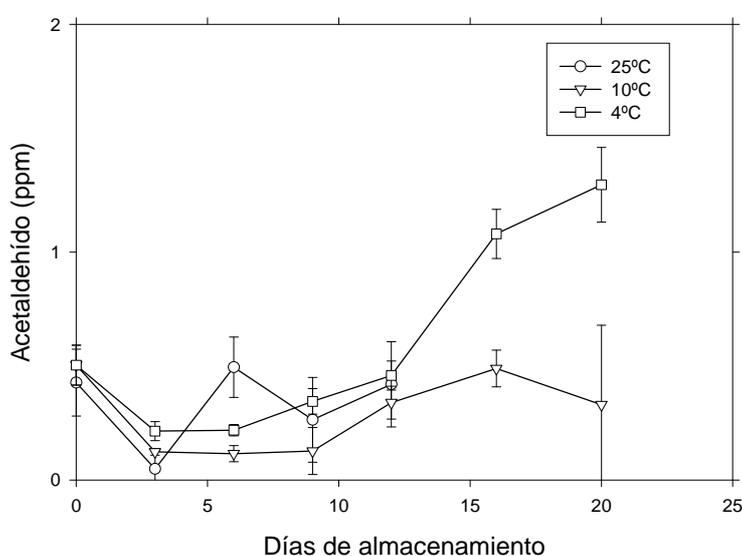


Figura 14. Niveles de acetaldehído en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Por otra parte fueron evidentes las diferencias significativas entre los niveles superiores de etanol presentes en los frutos sin acondicionar almacenados a 4°C con respecto a los de los frutos almacenados a 25 y 10°C ($p<0.05$) (Fig. 15). No se observaron diferencias significativas entre los frutos sin acondicionar almacenados a 10 y 25°C ($p>0.05$). Se observó una tendencia similar en los niveles de etanol en los frutos acondicionados (Fig.17).

No existieron diferencias significativas entre los frutos con y sin acondicionar con respecto a los niveles de etanol en todas las temperaturas de almacenamiento, excepto a los 16 y 20 días en los frutos acondicionados almacenados a 4°C, donde los niveles de etanol fueron mayores (Fig. 15 y 17) ($p>0.05$).

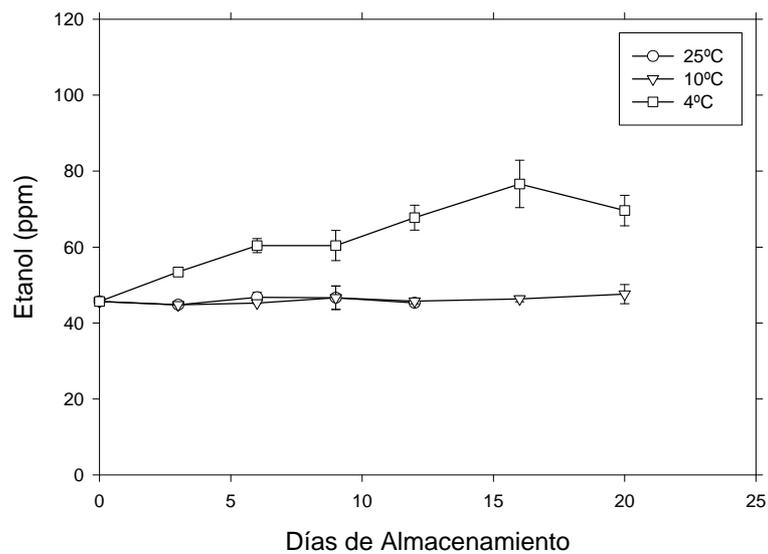


Figura 15. Niveles de etanol en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm su desviación estándar.

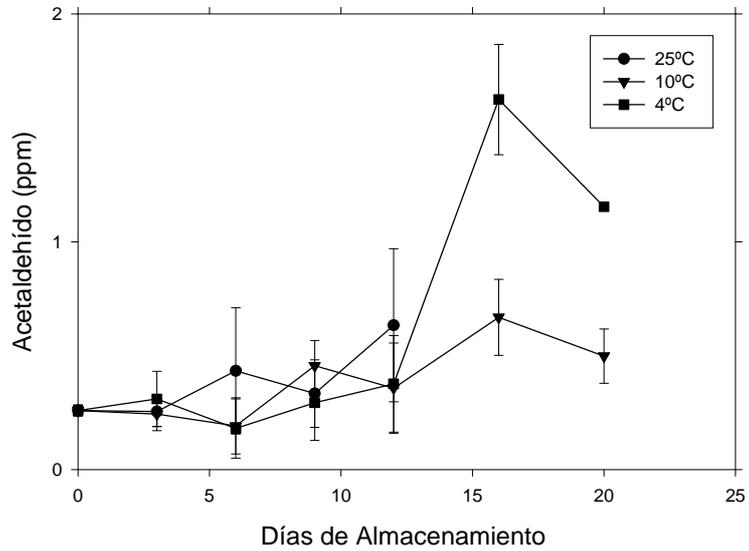


Figura 16. Niveles de acetaldehído en frutos de limón ‘Mexicano’ acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

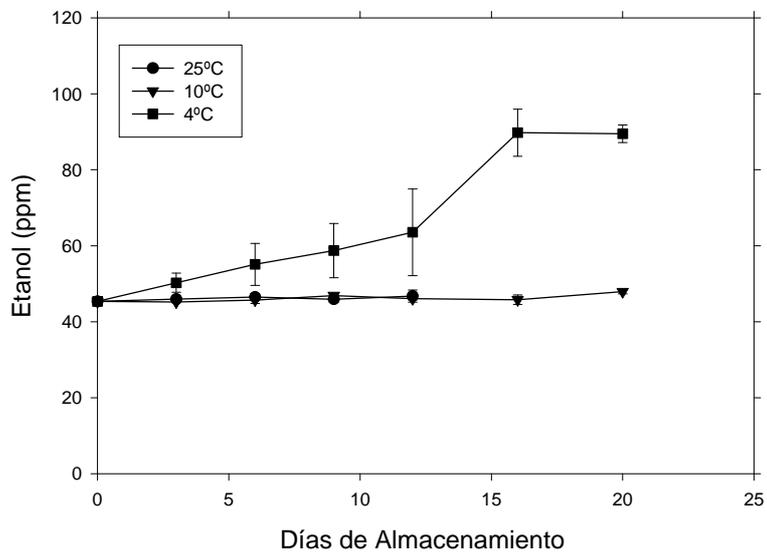


Figura 17. Niveles de etanol en frutos de limón ‘Mexicano’ acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

7.4. Compuestos aromáticos

No se detectaron ésteres (acetato de etilo, butanoato de metilo, hexanoato de metilo y hexanoato de etilo) en ninguna de las muestras de flavedo y jugo utilizando CG o CG-MS y con columnas empacada y capilar respectivamente, tanto en frutos sin acondicionar como en frutos acondicionados (Fig.18). El análisis de los cromatogramas indicó la presencia de compuestos terpénicos característicos de los cítricos (ver cuadro2).

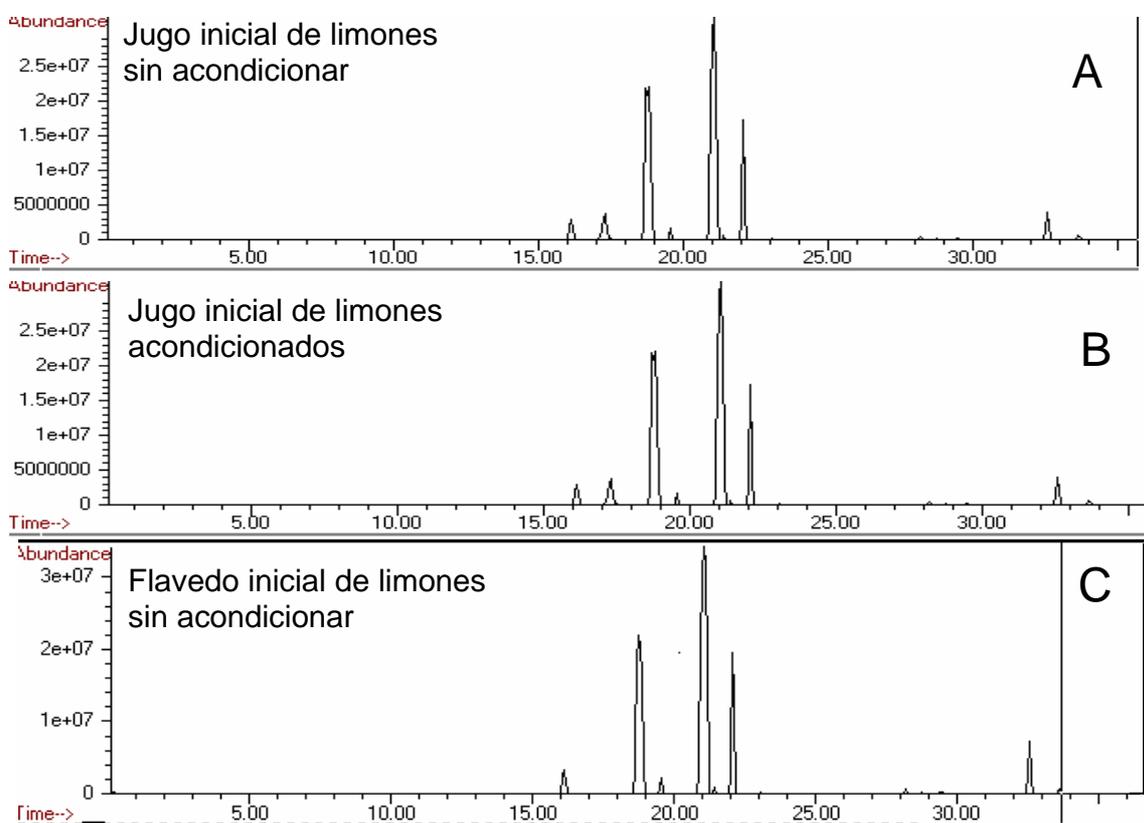


Figura 18. Cromatograma de compuestos volátiles presentes en jugo de limón 'Mexicano' con y sin acondicionar (B y A) y en flavedo de limones sin acondicionar almacenados a 4°C (C).

Cuadro 2. Compuestos volátiles característicos del aroma en los cítricos presentes en el jugo de limón 'Mexicano' con (B) y sin acondicionar (A) y en flavedo de limones sin acondicionar almacenados a 4°C (C).

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
α -Pineno	16.09
β -Pineno	18.76
β -Mirceno	19.54
d-limoneno	21.5
1-4 ciclo hexadieno-1-metil4- 1metil	22.04

7.5. Efecto del tratamiento de acondicionamiento (13°C por 48h) en el daño por frío y los niveles de lipoperoxidación en limón 'Mexicano'.

El daño por frío (DPF) solo se detectó en los frutos que fueron almacenados a 4°C. A esta temperatura el DPF incrementó significativamente después de 6 días en los frutos no acondicionados, mientras que en los frutos acondicionados aumentó fue menor durante todo el periodo de almacenamiento. Es decir, se detectó un marcado efecto protector del tratamiento de acondicionamiento a 13°C por 48 h contra el DPF, mostrando los frutos no acondicionados 1.6 veces más daño por frío que los frutos acondicionados a los 20 días de almacenamiento (Fig. 19).

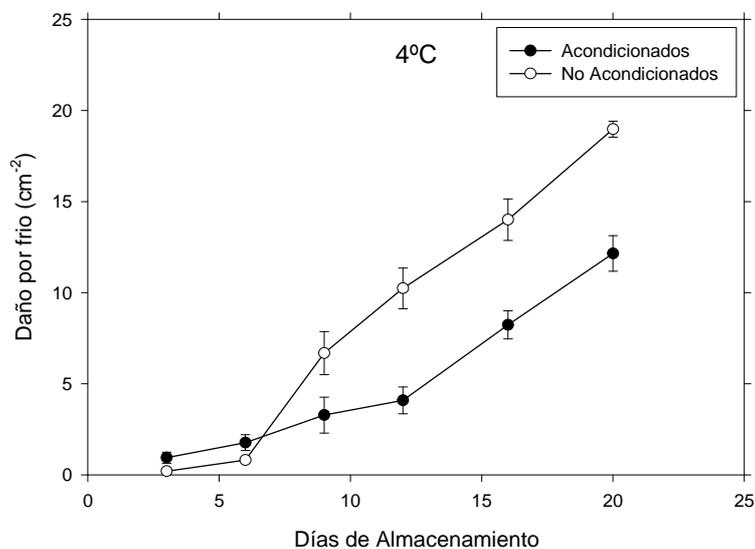


Figura 19. Daño por frío en frutos de limón 'Mexicano' almacenados a 4°C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Los niveles más altos de lipoperoxidación, como un índice de daño a membrana, se observaron en los frutos no acondicionados en comparación con los frutos acondicionados (Fig. 20 y 21). En los frutos no acondicionados almacenados en las diferentes temperaturas, los niveles más altos de daño a membrana se observaron a 4°C a los 6, 16 y 20 días de almacenamiento (Fig. 20). No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) a los 3 días con los frutos almacenados a 10°C, ni a los 9 y 12 días con respecto a los frutos almacenados a 10 y 25°C. En general los frutos almacenados a 10°C mostraron los niveles más bajos de lipoperoxidación con excepción de los 3, 6 y 9 días donde no se observaron diferencias significativas con respecto a las otras temperaturas de almacenamiento ($p > 0.05$). Los limones almacenados a 25°C mostraron los niveles más altos de lipoperoxidación a los 6 días, disminuyendo posteriormente y alcanzando valores similares a los encontrados en los frutos almacenados a 4 y 10°C (Fig. 20).

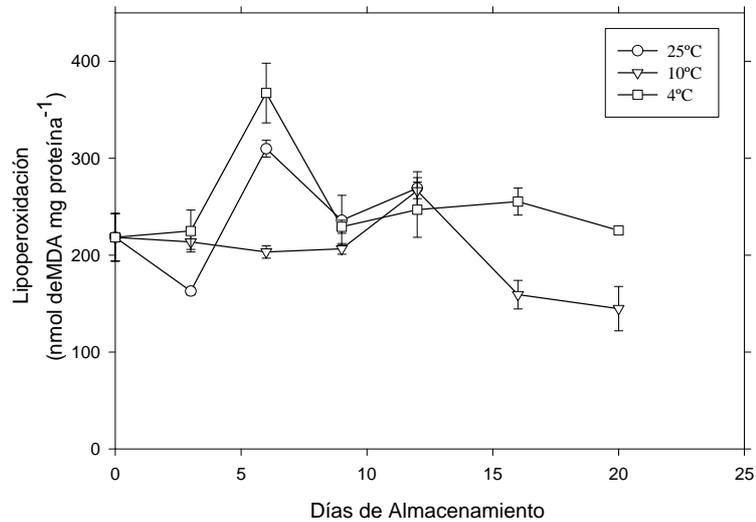


Figura 20. Niveles de lipoperoxidación en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

En los frutos acondicionados los niveles de lipoperoxidación fueron menores y más homogéneos en todas las temperaturas utilizadas en comparación con los frutos no acondicionados durante todo el periodo de almacenamiento (Fig. 20 y 21). Durante los primeros 9 días de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas entre los limones almacenados en refrigeración (4 y 10°C) ($p > 0.05$). Posteriormente los niveles de lipoperoxidación disminuyeron gradualmente en los frutos almacenados a 10°C, mientras que en los frutos almacenados a 4°C se mantuvieron constantes durante todo el periodo de almacenamiento (Fig. 21).

Los limones almacenados a 25°C mostraron altos niveles de lipoperoxidación después de tres días de almacenamiento, posteriormente el daño membranal disminuyó gradualmente hasta los 9 días y finalmente se observó un incremento a los 12 días, al final de su vida postcosecha (Fig.21)

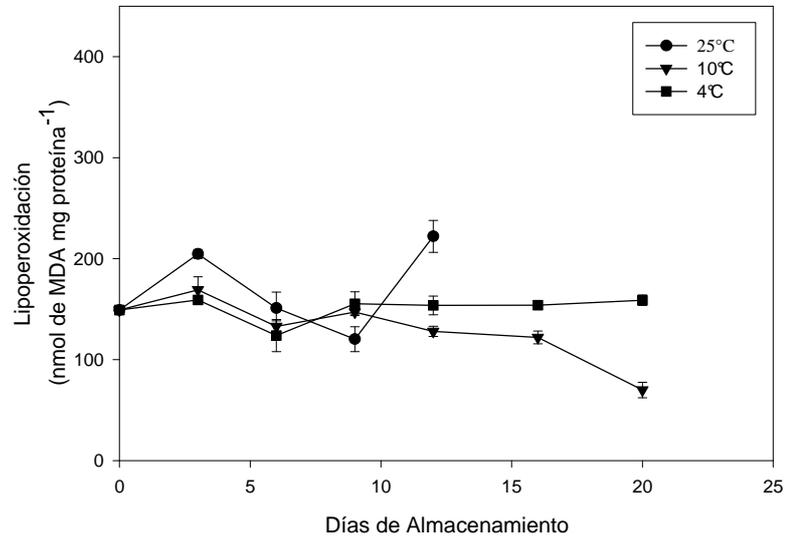


Figura 21. Niveles de lipoperoxidación en frutos de limón ‘Mexicano’ acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

7.6. Efecto del tratamiento de acondicionamiento (13°C por 48h) en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (PX) en limón ‘Mexicano’.

En general la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) disminuyó gradualmente a lo largo del periodo de almacenamiento en los frutos no acondicionados en todas las temperaturas utilizadas, con excepción del día 6 donde se observó un importante incremento en la actividad de la enzima en los frutos almacenados a 10°C (Fig. 22).

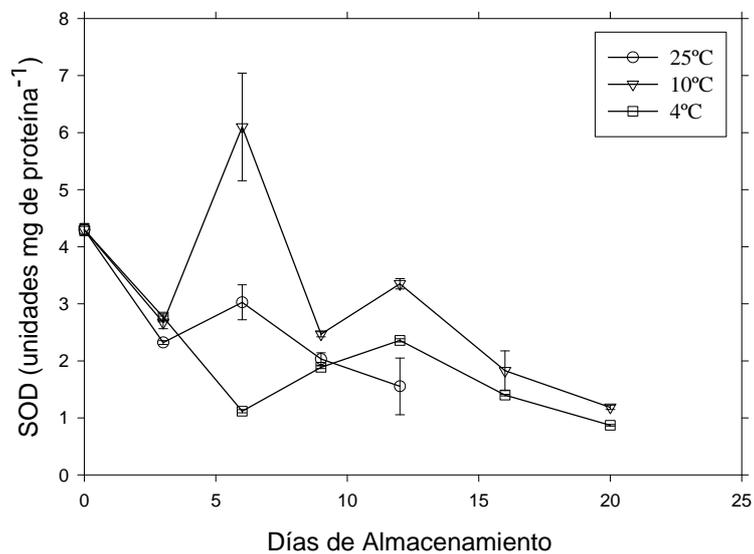


Figura 22. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

No se observó un incremento en la actividad de SOD en los limones acondicionados como resultado del tratamiento de acondicionamiento (Fig. 22 y 23).

Los frutos que fueron acondicionados exhibieron tendencias similares a los frutos sin acondicionar, por ejemplo se presentó una gradual disminución en la actividad de SOD a lo largo del periodo de almacenamiento en los frutos a 25°C. En los frutos acondicionados y almacenados a 10°C se observó una disminución inicial en la actividad de SOD, alcanzando su valor mínimo a los 9 días, seguido por un ligero incremento (Fig. 23).

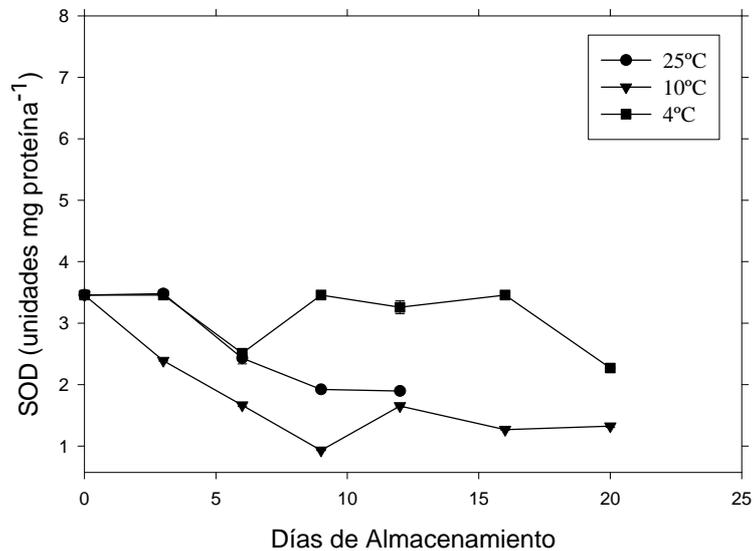


Figura 23. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en frutos de limón 'Mexicano' acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

A pesar de las tendencias similares mostradas por los limones acondicionados y sin acondicionar, los mayores niveles de actividad de SOD se observaron en los frutos acondicionados y almacenados a 4°C excepto por los primeros seis días donde no se observaron diferencias significativas con respecto a los frutos almacenados a 25°C ($p > 0.05$) (Fig. 23). Es importante resaltar que el daño por frío solo se detectó a 4°C y que la actividad de SOD se mantuvo durante el periodo completo de almacenamiento en los limones acondicionados en comparación con la disminución observada en la actividad de esta enzima en los frutos sin acondicionar (Fig. 23 y 22).

Los frutos sin acondicionar almacenados a 10°C y 25°C mostraron un incremento en los niveles de actividad de la Peroxidasa (PX) a lo largo del periodo de almacenamiento. Los niveles más altos de actividad de PX se encontraron en los frutos almacenados a 10°C. Sin embargo, en los frutos almacenados a 4°C se observó una disminución gradual en la actividad de esta enzima, después de los tres

primeros días, alcanzando su valor mínimo hacia el final del almacenamiento (Fig. 24).

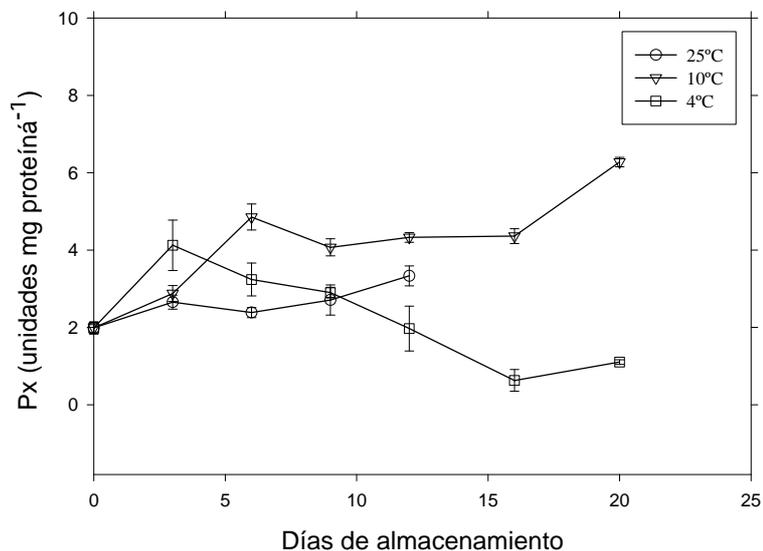


Figura 24. Actividad de peroxidasa (PX) en frutos de limón 'Mexicano' sin acondicionar y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Los limones acondicionados mostraron un incremento de 2.2 veces en la actividad de PX inmediatamente después del tratamiento de acondicionamiento, en comparación con los frutos no acondicionados (Fig. 24 y Fig. 25). En general, la actividad de PX se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento en todos los frutos almacenados en temperaturas de refrigeración, siendo los frutos almacenados a 10°C los que presentaron los niveles más altos de actividad de PX. En contraste, en los frutos almacenados a 25°C la actividad de PX disminuyó rápidamente durante los primeros días de almacenamiento. En los frutos acondicionados y almacenados a 4°C la actividad de PX fue sustancialmente mayor que en los frutos no acondicionados, durante la mayoría del periodo de almacenamiento (Fig. 25).

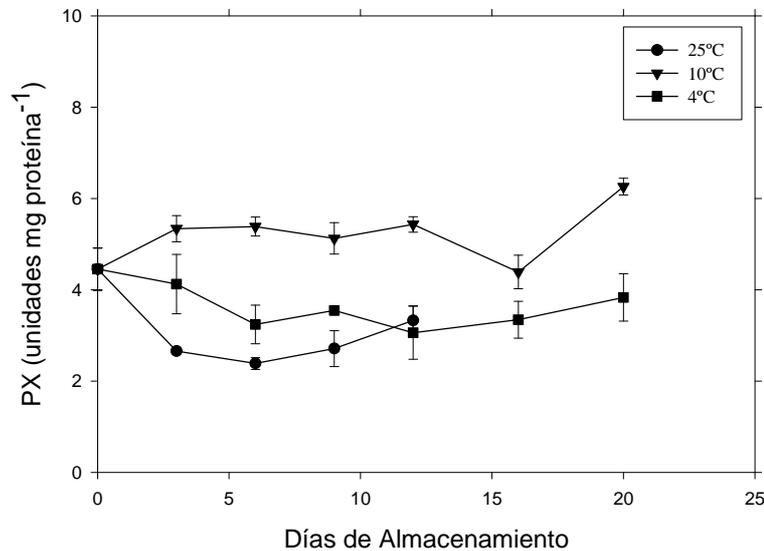


Figura 25. Actividad de peroxidasa (PX) en frutos de limón ‘Mexicano’ acondicionados (13°C por 48h) y almacenados a distintas temperaturas. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

7.7. Efecto del tratamiento de acondicionamiento (53°C por 3min) en la actividad enzimática de la peroxidasa (PX), superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de lipoperoxidación en limón Persa (*Citrus latifolia* T).

En los frutos sin acondicionar y almacenados en las diferentes temperaturas de refrigeración la actividad de PX fue mayor ($p < 0.01$) que la observada en los frutos almacenados a 25°C durante los 6 primeros días. Posteriormente no se observaron diferencias significativas en la actividad de PX entre los frutos almacenados en refrigeración y los frutos almacenados a 25°C. El acondicionamiento con calor húmedo incrementó significativamente la actividad de PX (2.6 veces) inmediatamente después de su aplicación (análisis inicial). Sin embargo este incremento no se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento y disminuyó en todas las temperaturas de almacenamiento hasta alcanzar niveles similares a los observados en los frutos no acondicionados (Fig. 26).

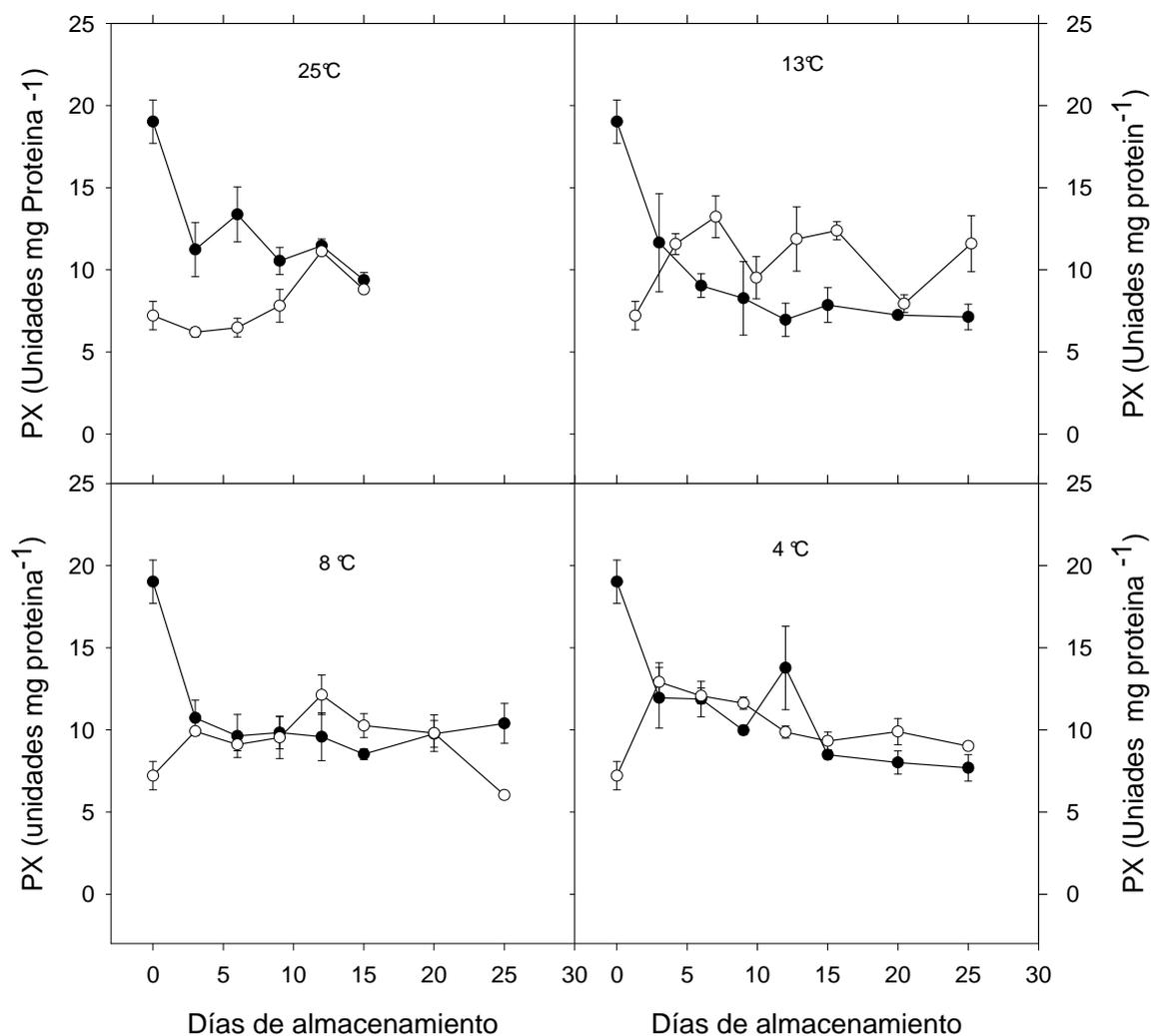


Figura. 26 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad de la peroxidasa en frutos de limón Persa con y sin acondicionamiento. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

En general, el comportamiento de SOD fue similar a la actividad observada en la enzima PX. Durante los primeros días de almacenamiento la actividad de la SOD fue más alta en los frutos sin acondicionar y almacenados en refrigeración, en especial a 13°C en comparación con los limones almacenados a 25°C ($p < 0.05$). Posteriormente, la actividad de SOD a 13°C alcanzó valores similares a los observados a 25, 8 y

4°C. De igual manera que en PX, el acondicionamiento con calor húmedo incrementó la actividad de SOD (1.7 veces, $p < 0.05$) inmediatamente después de tratamiento (análisis inicial). Sin embargo, este incremento no se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento y disminuyó en todas las temperaturas de almacenamiento hasta alcanzar niveles similares a los observados en los frutos no acondicionados (Fig. 27).

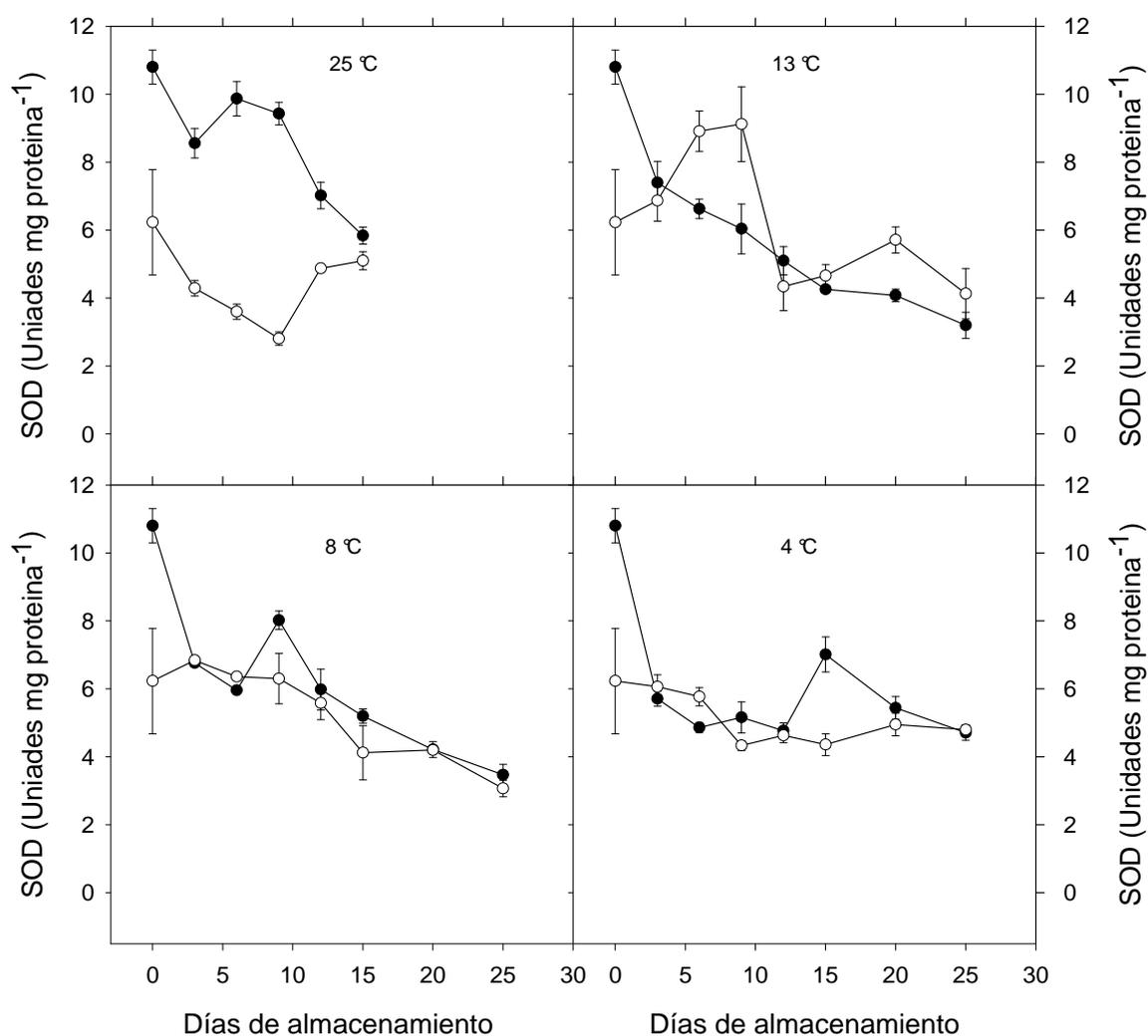


Figura. 27 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad de la Superóxido dismutasa en frutos de limón Persa con y sin acondicionamiento. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Los frutos sin acondicionar y almacenados en refrigeración tuvieron niveles significativamente más bajos de lipoperoxidación durante los primeros 6 días de almacenamiento en comparación a los observados en los frutos almacenados a 25°C ($p < 0.05$). Posteriormente no se observaron diferencias significativas en los niveles de daño membranal durante todo el periodo de almacenamiento y en ninguna de las temperaturas utilizadas.

El acondicionamiento con calor húmedo causó un incremento de 2.6 veces en los niveles de lipoperoxidación (análisis inicial). Los niveles más altos de lipoperoxidación se observaron en los frutos acondicionados y almacenados a 25°C durante todo el periodo de almacenamiento. Sin embargo, los frutos acondicionados y almacenados en temperaturas de refrigeración mostraron una significativa disminución en los niveles lipoperoxidación en comparación con el valor inicial, manteniendo esta tendencia durante todo el periodo de almacenamiento (Fig. 28).

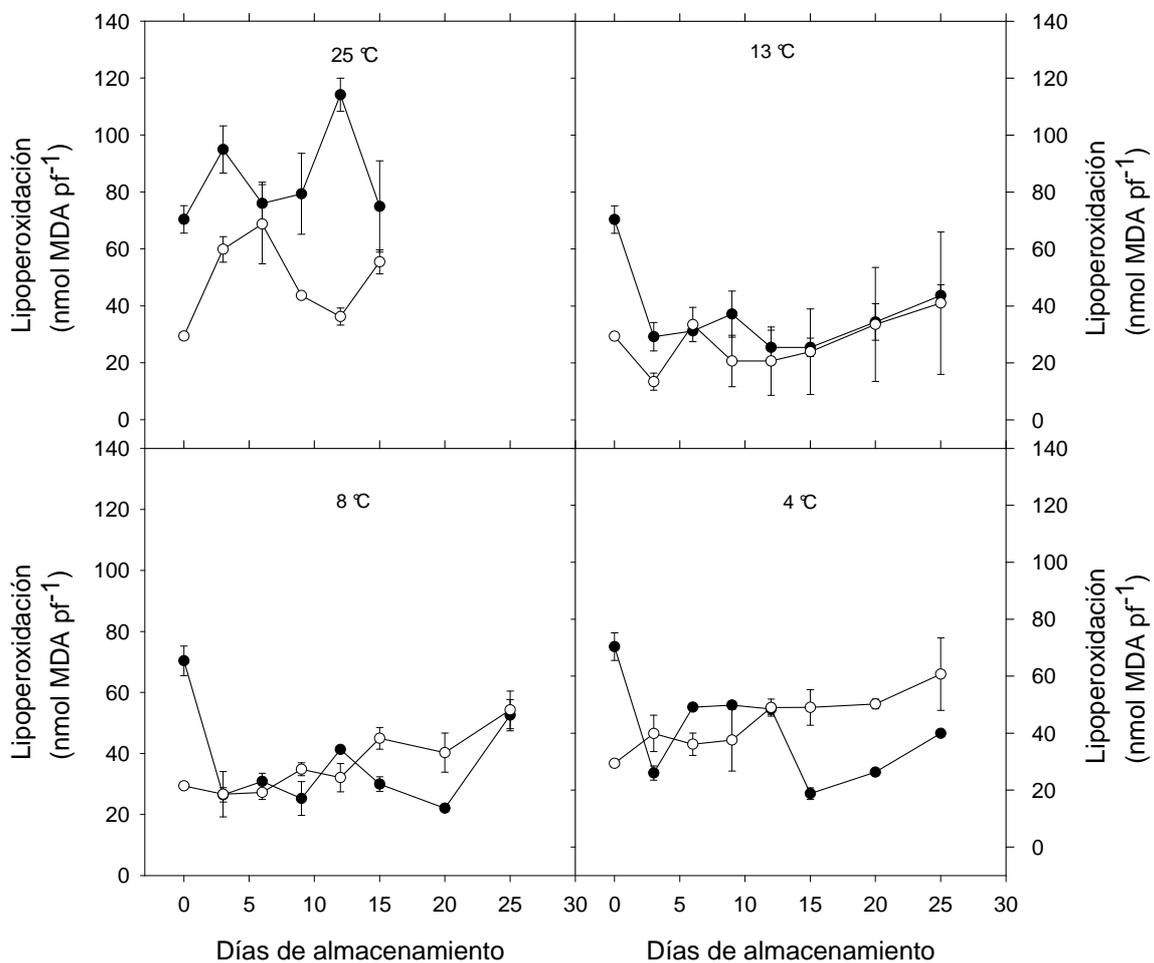


Figura. 28 Efecto de la temperatura de almacenamiento en los niveles de lipoperoxidación medidos como malondialdehído en frutos de limón Persa con y sin acondicionamiento. Cada valor es el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

8. DISCUSION

En general los cambios en el color del flavedo de los frutos fueron de un verde oscuro brillante ($C^*=37.9$ y $h^*=107.3$) a un amarillo profundo ($C^*=50$ y $h^*=102.7$) en los frutos sin acondicionar almacenados a 25°C y a un verde alimonado brillante ($C^*=36.8$ y $h^*=100.2$) en los frutos sin acondicionar almacenados en refrigeración (Fig. 7, 8, 10 y 11). Sin embargo, en los frutos acondicionados se observó un efecto positivo ($p<0.05$) inmediatamente después del acondicionamiento presentando valores de cromaticidad menores ($C^*= 26.95$, menos vívido) a los observados en los frutos sin acondicionar ($C^*=37.92$) (Fig. 10 y 7). Estos valores podrían ser explicados asumiendo que las clorofilas a y b características que proporcionan el color verde oscuro dominante en los limones ó limas agrias inmaduros se degraden más lentamente durante la aplicación del tratamiento (13°C por 48 h) ya que la baja temperatura trae como consecuencia una disminución del metabolismo, dando como resultado un retardo en la maduración, Sin embargo, a tiempos posteriores (12 días) alcancen valores de cromaticidad superiores a los observados en los frutos sin acondicionar, probablemente debido al proceso de maduración de consumo, donde la cantidad de clorofilas disminuye y los pigmentos amarillos y naranjas empiezan a incrementar en el flavedo (Kitinoja y Kader, 2003).

El comportamiento observado en la pérdida fisiológica de peso en los frutos con y sin acondicionamiento fue similar en ambos casos (Fig. 12, y 13), aunque los frutos acondicionados presentaron mayores porcentajes de PFP en todas las temperaturas de almacenamiento utilizadas, cabe señalar que el máximo valor de PFP alcanzado durante todo el periodo de almacenamiento en los frutos acondicionados y almacenados en refrigeración (4 y 10°C) fue de 0.96% (Fig. 12, y 13).

No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles de acetaldehído observados entre los frutos con y sin acondicionamiento durante los primeros 12 días de almacenamiento en ninguna de las temperaturas utilizadas. Sin embargo, cabe señalar la acumulación de acetaldehído hacia el final del almacenamiento en los frutos almacenados a 4°C en ambos tratamientos. De igual manera, los niveles de etanol fueron mayores en los frutos almacenados a 4°C (Fig. 14 y 16). Se han reportado resultados similares para frutos de toronja 'La Toma Rouge', donde el acondicionamiento con baja temperatura incrementó significativamente los niveles de acetaldehído y etanol (Biolatto, y col; 2005). Sin embargo, las cantidades detectadas fueron similares a las determinadas en jugo fresco, concluyendo que las características sensoriales no fueron afectadas por el tratamiento de acondicionamiento. Sin embargo, en nuestro caso las características sensoriales tales como el sabor dulce, ácido y amargo, así como el sabor típico y olor intenso del limón 'Mexicano' no fueron evaluadas, por lo que la comprobación de estos resultados requiere de un trabajo posterior de análisis sensorial.

Existen numerosos estudios sobre la composición química de volátiles tanto en flavedo como en pulpa de diferentes cítricos tales como limas y limones (Lotta y col., 2000), naranjas (Homatidou y col., 1992; Moshonas y Shaw, 1994), mandarinas (Moshonas y Shaw, 1997) y tangerinas (Moshonas y Shaw, 1972 y 1974).

Por otra parte, se ha reportado la presencia de ésteres en algunos cultivares de limas y limones (Njoroge y col., 1996; Lotta y col., 2002). La reacción de esterificación entre los ácidos carboxílicos y los alcoholes, corresponde al paso final de la biosíntesis de ésteres y está considerada como la reacción clave en la ruta de biogénesis de los ésteres. La alcohol acil transferasa (AAT), es la enzima que cataliza la reacción de esterificación en las plantas. Esta reacción que culmina con la formación de un éster a partir de un alcohol y un ácido activado como la acetil CoA (Olías, y col., 1995). Sin embargo, en los resultados obtenidos en el presente trabajo no se encontraron ésteres ni en el flavedo ni en el jugo de limones con y sin

acondicionamiento (Fig.18). Entre los factores involucrados en la síntesis de ésteres en las frutas se encuentra la disponibilidad de precursores (ácidos grasos, aminoácidos, alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos) y la presencia y actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol acil transferasa (AAT). Sin embargo, no hay que olvidar que no solo la enzima responsable del paso final en la biosíntesis de un compuesto volátil particular es un factor limitante, sino también el suministro de los sustratos en la célula es un factor importante en la regulación de la producción de compuestos volátiles (Dudareva, y col., 2004). Dado que ya se ha reportado la presencia de los sustratos para la reacción de esterificación, la ausencia de ésteres en el perfil aromático de limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S) podría deberse a la ausencia de la enzima AAT o bien a que se encuentre presente en forma inactiva o que el método de extracción usado no haya sido el adecuado. La comprobación de estas alternativas requiere un trabajo posterior.

El estrés oxidativo inducido por bajas temperaturas y otros factores ambientales ha sido asociado con el desarrollo del DPF. De igual manera, se ha reportado que la aplicación de un estrés moderado produce una mayor tolerancia a un estrés más severo mediante la inducción de los mecanismos antioxidantes (Sala y Lafuente, 1999; Kang y Salveit, 2001). De acuerdo con esta idea, se han reportado diferentes tratamientos de pre-almacenamiento con calor (tolerancia cruzada) o con frío (acondicionamiento) que reducen el DPF en cítricos (Huock y col., 1990; Rodov y col., 1995; Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; Porat y col., 2000). Los resultados de este trabajo muestran una correlación positiva entre la efectividad del tratamiento de acondicionamiento con frío a 13°C, la reducción del daño por frío, la permanencia o inducción de las enzimas antioxidantes SOD y PX y la reducción de los niveles de lipoperoxidación.

Los síntomas de DPF solo fueron detectados en los limones (*Citrus aurantifolia* S.) almacenados a 4°C y el acondicionamiento a 13°C por 48 h redujo 1.6 veces el área dañada hacia al final del periodo de almacenamiento (veinte días). De acuerdo a

diversos autores la tolerancia al daño por frío está asociada con la inducción de enzimas antioxidantes (CAT, SOD y APX) en frutos acondicionados, y estos incrementos se mantienen a lo largo del periodo de almacenamiento en frío (Sala y Lafuente, 1999; Kang y Saltveit, 2001). En resultados preliminares, nosotros reportamos que el acondicionamiento con calor húmedo (53°C por 3 min) en limón Persa (*Citrus latifolia* T.) produjo un incremento significativo pero pasajero en la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y PX) inmediatamente después del tratamiento, Inducción que se perdió al transcurrir el periodo de almacenamiento. Estos resultados junto con los síntomas de daño por frío observados sugieren que la efectividad del acondicionamiento depende de que la inducción de las enzimas antioxidantes se mantenga durante todo el periodo de almacenamiento (Fig. 26, 27 y 28) (Rivera y col., 2004).

En limón 'Mexicano' no encontramos un incremento significativo en la actividad de SOD en los limones acondicionados y almacenados a 4°C. Sin embargo, esta actividad se mantuvo constante durante todo el periodo de almacenamiento en comparación con la disminución de la actividad de SOD observada en los frutos sin acondicionar almacenados a la misma temperatura (Fig. 22 y 23).

Por otra parte, se observó un incremento de 2.2 veces en la actividad de PX en los limones acondicionados y almacenados a 4°C y este incremento se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento en comparación con la disminución observada en la actividad de PX en los frutos no acondicionados y almacenados a esta temperatura (Fig. 24 y 25). Estos resultados apoyan la propuesta de que la efectividad de los tratamientos de acondicionamiento depende de la inducción o la permanencia de los sistemas antioxidantes durante todo el periodo de almacenamiento. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que el tratamiento de acondicionamiento que protege contra el DPF comparte un mecanismo común con los tratamientos de tolerancia cruzada, ya que ambos son capaces de reducir el daño por frío, previniendo el estrés oxidativo.

El peróxido de hidrógeno ha sido propuesto como un mensajero que responde a diferentes tipos de estrés. Se ha sugerido que la acumulación de H_2O_2 durante la primera fase del proceso de infección de una herida es un factor importante que determina la sensibilidad del fruto a la infección. La susceptibilidad está principalmente determinada por las diferencias entre la generación de H_2O_2 por (SOD) y las enzimas que lo suprimen (CAT y PX). Como consecuencia la acumulación de H_2O_2 en frutos resistentes enciende los mecanismos de defensa (Torres y col., 2003).

Al igual que Torres y colaboradores (2003), Sala (1998) encontró que los cultivares tolerantes al DPF tenían una mayor capacidad para dismutar el H_2O_2 por medio de las enzimas CAT y PX, siendo ésta la principal diferencia entre los cultivares susceptibles y resistentes al DPF. El incremento observado, en el presente trabajo, en la actividad de PX en los limones acondicionados apoya esta idea. Sin embargo, aún se necesitan más trabajos para entender y definir el papel de H_2O_2 en este proceso, ya que no se cuantificó este metabolito en el presente trabajo.

Posmyk y colaboradores (2001) sugirieron que en la germinación de semillas de soya la sensibilidad al daño por frío estaba asociada con la lipoperoxidación. Sin embargo, los resultados preliminares que obtuvimos en limón Persa no concuerdan con la idea de que la lipoperoxidación es un mecanismo inherente del daño por frío, ya que los niveles de lipoperoxidación encontrados en los frutos almacenados en temperaturas inductoras de daño por frío (4 y 8°C) fueron similares a los observados en los frutos almacenados en temperaturas no inductoras de daño por frío (13°C) (Fig. 28) (Rivera y col., 2004). En limón 'Mexicano' no se encontró ninguna correlación entre el daño por frío y los niveles de lipoperoxidación. Una posible explicación a esta controversia, es la sugerencia de que las plantas experimentan estrés oxidativo posterior al DPF, cuando son transferidas de las temperaturas inductoras del DPF a temperatura ambiente (Saruyama y Tanida, 1995). Hariyarda y Parkin (1991) encontraron que en plántulas de pepino la lipoperoxidación fue inducida durante el periodo de estancia en

condiciones ambientales, no en el periodo de exposición a bajas temperaturas. Es importante mencionar que en este trabajo los niveles de lipoperoxidación se midieron inmediatamente después del almacenamiento en frío, por lo que el efecto de la temperatura ambiente no fue determinado.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que aunque el acetaldehído y el etanol se acumulan hacia el final del almacenamiento en los frutos con y sin acondicionamiento almacenados en la temperatura crítica inductora de DPF (4°C), estos metabolitos no son indicadores tempranos del DPF en frutos de limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S).

Por otra parte, la ausencia de ésteres en el perfil aromático de jugo y flavedo observado, puede deberse a la ausencia de la enzima AAT, a que se encuentra presente en forma inactiva o que el método de extracción usado no haya sido el adecuado. Sin embargo, también habría que considerar la presencia y cantidad de los sustratos de esta enzima en las muestras, ya que tienen un papel importante al ser un factor limitante en la regulación de la producción de compuestos volátiles en las células vegetales. La comprobación de estas alternativas requiere de un trabajo posterior.

Se observó un efecto protector del acondicionamiento al DPF con el tratamiento de acondicionamiento con frío a 13°C por 48 h en limón 'Mexicano' el cual previene el daño por frío en los frutos almacenados a 4°C.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la inducción o permanencia de las enzimas antioxidantes son un factor esencial para que los tratamientos de acondicionamiento funcionen como protectores contra el DPF.

10. BIBLIOGRAFÍA

Azcon-Bieto, J. y Talon, M. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1^{ra} edición. España. (1993).

Balandran-Quintana, R. R.; Mendoza-Wilson, A. Ma. Gardea-Bejar, A. A. Vargas-Arispuro, I. y Martinez-Tellez, M.A. 2003. Irreversible chilling injury in zucchini squash (*Cucúrbita pepo* L.) could be a programmed even long before the visible symptoms are evidents. Biochem. Biophys. Res. Commun. 307: 553-557.

Beyer, W. y Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxidase dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. Anal. Biochem. 161: 559-566.

Biolatto, A., Vazquez, D. E. Sancho, A. M. Carduza, F. J. y Pensel N. A. 2005. Effect of comercial conditioning and cold quarantine storage treatments on fruits quality of 'Rouge La Toma' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). Postharv. Biol. Technol. 32: 167-176.

Bohnert, H.J. y Sheveleva K.I. 1998. Plant stress adaptations-making metabolism move. Curr Opin. Plant Biol. 1: 269-273.

Borg, D.C. y Snaich, K.M. 1998. Iron and hydroxil radicals in lipid oxidation: Fenton reactions in lipids and nucleic acids co-oxidized with lipid. p. 427-441. In: Cerutti, P.A., Fridovich, I. y McCord, J.M. (Eds.). Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Alan R. Liss. New York.

Bowler, C., Van Montagu, M. y Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.

Bruemmer, J. H. 1986. Regulation of acetaldehyde and ethanol accumulation in citrus fruit. Biogenesis of Aromas. 22: 275-285.

Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. p. 302-310. In: Fleisher, S. y Packer, L. (eds). *Methods in Enzimology*, Vol. 52. Academic Press. New York.

Christensen, J.H., Bauw, G., Welinder, K.G., Van Montagu, M. y Boerjan, W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol.* 118: 125-135.

Claridades Agropecuarias. 2002. La competitividad de la cadena productiva del limón Mexicano. SAGARPA. No. 104: 3-33.

Dat. J., Vandenamee, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. y Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57: 779-795.

Davies, F.S. y Albrigo L.G. 1994. *Citrus*. Cab International, Reino Unido.

Dudareva, N., Pichersky, E. y Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135: 1893-1902.

Dussel, P. E. 2002. Territorio y competitividad en la agroindustria en México: Condiciones y propuestas de política para los clusters del limón 'Mexicano' en Colima y la piña en Veracruz. 270 p. Ed. Plaza y Valdéz, S. A de C. V. 1^{ra} edición. México D.F.

Eckert, J. W. y Eask I.L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruit. p. 174-260. In: Reuther, W. E., Calavan, E.C. y Carman, G.E. (eds.) *The Citrus Industry*. Vol. V, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Cal., U.S.A.

Elkahoui, S., Hernández, J. A., Abdelly, C., Ghir, R. y Limam, F. 2005. Effects of salt on lipoperoxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharantus roseus* suspension cells. *Plant Sci.* 168: 607-613.

Erez, A., Cohen, E. y Frenkel, C. 2002. Oxygen-mediated cold acclimation in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiol Plant.* 115: 541-549.

Esterbauer, H., Schaur, R. J. y Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-128.

Fallik, E. 2004. Prestorage hot water (immersion, rinsing and brushing). *Postharv. Biol. Technol.* 32: 125-134.

FAOSTAT Database. 2004. Results. Htm. <http://www.fao.org>

Forney, Ch. F., Kalt, W. y Jordan, M. A. 2000. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity and storage. *HortSci.* 35: 1022-1026.

Foyer, C. H., López-Delgado, H., Dat, J. F. y Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxidase and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.

Golias, J. y Bottcher, H. 2002. Postharvest response of apple fruits alter storage in extreme gas concentrations II. The occurrence of anaerobic metabolites. *Gartenbauwissenschaft.* 67: 72-77.

Gross, K., Wang, C. Y., y Salveit, M. E. 2002. The commercial storage of fruit, vegetables and florist and nursery stocks. USDA Agr. Hndbk. 66 (<http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index/html>).

Hariyarda, P. y Parkin, K. I. (1991). Chilling-induced oxidative stress in cucumber fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 1: 33-45.

Holland, N., Menezes H. C. y Lafuente, M. T. 2002. Carbohydrates as related to the heat-induced chilling tolerance and respiratory rate of 'Fortune' mandarin fruit harvested at different maturity stages. *Postharv. Biol. Technol.* 25: 181-191.

Homatidou, V. I., Karvouni, S. S., Dourtoglou, V. G. y Poulos, C. N. 1992. Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. Variety cantaloupensis. *J. Food Chem.* 40: 1385-1388.

Huock, L. G., Jenner, J. F. y Bianchi, J. 1990. Holding lemon fruit at 5°C or 15°C before cold treatment reduces chilling injury. *HortSci.* 25:1174.

Imahori, Y., Matushita, K., Kota, M., Ueda, Y., Ishimaru, M., y Chachin, K. 2003. Regulation of fermentative metabolism in tomato fruit under low oxygen stress. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78: 386-393.

Kang, H. y Saltveit, M. E. 2001. Activity of enzymatic antioxidant defence systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physiol Plant.* 113: 548-556.

Kar, M. y Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physio.* 57: 315-319.

Ke, D., Goldstein, L. M., O'Mahony, M. y Kader, A. A. 1991. Effect of short term exposure to low O₂ and high CO₂ atmospheres on quality attributes of strawberry. *J. Food Sci.* 56: 50-54.

Ke, D., Zhou, L., y Kader, A. A. 1994. Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 971-975.

Kermasha, S. y Metche, M. 1988. Studies on seed peroxidase *Phaseolus vulgaris* cv, haricot. J. Food Sci. 53: 247-252.

Kitinoja, L. y Kader, A.A. 2003. Técnicas de Manejo Postcosecha a pequeña escala: Manual para los Productos Hortofrutícolas. 4a Ed. Univ. Calif. Series Horticultura No. 8. Universidad de California Davis. California, EUA.

Kramer, G. F. y Wang, C. Y. 1989. Reduction of chilling injury in zucchini squash by temperature management. HortSci. 24: 995-996.

Kratsch, H.A. y Wise, R.R. 2000. The ultrastructure of chilling stress. Plant Cell and environment. 23: 337-350.

Lacan, D. y Baccou, J. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. Planta. 204: 377-382.

Lara, I., Miro, R. M., Fuentes, T. Sayes, G., Graell, J. y López, M. L. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term-controlled atmosphere conditions. Postharv. Biol. Technol. 29: 29-39.

Larsen, M. y Watkins, C. B. 1995. Firmness and concentration of acetaldehyde, ethyl acetate and ethanol strawberries stored in controlled and modified atmospheres. Postharv. Biol. Technol. 5: 39-50.

Lota, M. L., De Rocca, D. Tomi, F., Jacquemond C. y Casanova J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. J. Agric. Food Chem. 50: 796-805.

Loussert, R. 1992. Elementos morfológicos y biológicos. En: Los agrios. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. p.50.

McColloch, L. P. 1962. Chilling injury and alternaria rot of bell peppers. U.S. Department of Agriculture Marketing Research Report No. 536.

Moshonas, M.G. y Shaw, P. E. 1972. Analysis of volatile flavor constituents from tangerine essence. J. Agric. Food Chem. 20: 70-71.

Moshonas, M.G. y Shaw, P. E. 1974. Quantitative and qualitative analysis of tangerine peel oil. J. Agric. Food Chem. 22: 282-284.

Moshonas, M.G. y Shaw, P.E. 1994. Quantitative determination of 46 constituents in fresh, unpasteurized orange juices using dynamic headspace gas chromatography. and qualitative analysis of tangerine peel oil. J. Agric. Food Chem. 42: 1525-1528.

Moshonas, M.G. y Shaw, P.E. 1997. Quantitation of volatile constituents in mandarin juices and its use for comparison with the orange juices by multivariate analysis. J. Agric. Food Chem. 45: 3968-3972.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sci. 7: 405-410.

Nagy, S. 1996. Factors affecting the flavor of citrus fruits and their juice products. p. 102-133. In: Nagy, S., Chen, C. S. y Shaw, P. E. (Eds). Quality control manual for citrus processing plants. Vol III. Agscience Inc. Florida.

Njoroge, S, M., Ukeda, H., Kusunose, H., y Sawamura, M. 1996. Japanese sour *Citrus* Fruits. Part V. Volatile compounds of naoshichi and Tahiti lime essential oils. Flavour Fragrance J. 11: 25-29.

Noctor, G. y Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-279.

Obenland, D. M., Margosan, D.A., Huock L. G. y Aung L. H. 1997. Essential oils and chilling injury in lemon. *HortSci.* 32: 108-111.

Olias, J. M., Sanz, C. Ríos, J. J., y Pérez, A. G. 1995. Substrate specificity of alcohol acyl transferase from strawberry and banana. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 41: 1462-1466.

Osorio-Mora, O. y Zacarías, L. 2000. Efecto de las bajas temperaturas en la biosíntesis de etileno en discos de flavedo de la mandarina 'Fortune'. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.* 3: 53-64.

Pelayo, Z. C. 2001. Controlled atmosphere –induced changes in strawberry flavor with emphasis on aroma compounds. Ph. D. Dissertation. University of California-Davis. pp.135.

Pelayo, Z., Ebeler, E. S. y Kader, A. A. 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5°C in air or air + 20 Kpa CO₂. *Postharv. Biol. Technol.* 27: 171-183.

Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascobate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462.

Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben-Yehoshua., S. Y Lurie, S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. *Postharv. Biol. Technol.* 18: 159-165.

Posmyk, M. M., Corbineau, F., Vinel, D., Bailly, C. y Come, D. (2001). Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. *Physiol Plant.* 111: 473-482.

Prasad, T. K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10: 1017-1026.

Purvis, A. C. 1997. The role of adaptative enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissues. *HortSci.* 32: 1165-1168.

Purvis, A. C. 2004. Regulation of oxidative stress in horticultural crops. *HortSci.* 39: 930-932.

Rivera, C. F., Rodríguez, S. Z., Díaz de León, S. F., Bósquez, M. E., Domínguez, S. J., Chávez, F. S., Cajustes, B. J. y Pérez, F. L. 2004. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes of refrigerated persian limes (*Citrus latifolia* Tanaka) as influenced by a pre-storage hot treatment. *J Food Biochem.* 28: 305-317.

Rivero, R. M., Ruíz, J. M., García, P. C., López-Lefebvre, L. R. Sánchez, E. y Romero, L. 2002. Response of oxidative metabolism in watermelon plants subjected to cold stress. *Funtional Plant Biol.* 29: 643-648.

Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albagli, R. y Fang, D. Q. 1995. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot waters dips. *Postharv. Biol. Technol.* 5: 119-127.

Robinson, D. S. 1991. Peroxidases and catalases in foods. Robinson, D. S., Eskin, M. N. (Eds). In: *Oxidative Enzymes in Foods*. Elsevier Science Publishers LTD. England. p.1-9.

Sala, J. M. 1998. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarins fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 113: 255-261.

Sala, J. M. y Lafuente, M. T. 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid fortune mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2410-2414.

Saruyama, H. y Tanida, M. (1995). Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 109: 105-113.

Schirra, M., D'Hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Ben-Yehoshua, S. y Lurie, S. 2000. Chilling injury and residue uptake in cold-storage 'Star Ruby' grapefruit following thiabendazole and imazalil dip treatments at 20 and 50°C. *Postharv. Biol. Technol.* 20: 91-98.

Shewfelt, R. L. y del Rosario, B. A. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortSci.* 35: 575-579.

Shewfelt, R. L. y Purvis, A.C. 1995. Toward a comprehensive model for lipoperoxidation in plant tissue disorders. *HortSci.* 30: 213-218.

Sinha, S., Saxena, R. y Singh, S. 2005. Chromium induced lipoperoxidation in plants of *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidants and antioxidants enzymes. *Chemosphere.* 58: 595-604.

Snaich, K. M. 1992. Metals and lipid oxidation. *Contemporary issues. Lipids.* 27: 209-218.

Sundar, D., Perianayaguy, B. y Ramachandra, R. A. 2004. Localization of antioxidant enzymes in the cellular compartments of sorghum leaves. *Plant Growth Regul.* 44: 157-163.

Tester, M. y Bacic, A. 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiol.* 137: 791-793.

Ting, S. V. y Attaway, J. A. 1971. Citrus fruit. In: *The biochemistry of fruit and their products*. Vol. 1. Ed. Hulme, A.C. Academic Press. London pp. 107-369.

Toivonen. P. M. A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *HortScience*. 39: 938-942.

Torres, R., Valentines, J., Usall, I., Viñas, C. y Larrigaudiere. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit. *Physiol Plant*. 27: 235-242.

Wardowski, W. F., Nagy, S. y Grierson, W. 1986. *Fresh citrus fruits*. Wesport, Conn. AVI Publishing Co., pp.571.

Wills, R.H. y Lee, T.H. 2002. *Fisiología y manipulación postcosecha de frutas y hortalizas*. Ed. Acriba, S.A. Zaragoza España.

Wise, R. R. y Naylor A. W. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiol.* 83: 272-277.

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. Y Shigeoka S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123: 223-23.

Zhang, J. J. y Watkins, C. B. 2005. Fruit fermentation products, and activities of associated enzymes during elevated treatment of strawberry fruit at high and low temperatures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130: 124-130.

Zhang, Z. J., Creelman, R. A. y Zhu Jian-kant. 2004. From the laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engenieer salt, cold and drought tolerance in crops. *Plant physiol.* 135: 615-621.

Zkiewicz, M., Skorzyn, Ska-polit. E. y Krupa, Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals.* 17: 379-387.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Parámetros indicadores de inducción y
protección al daño por frío (DPF) en frutos de
limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.).

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA
M en C. Fernando Rivera Cabrera.

Comité Tutorial:

Co-tutora: Dra. Laura Josefina Pérez Flores.

Co-tutora: Dra. Clara Pelayo Zaldívar.

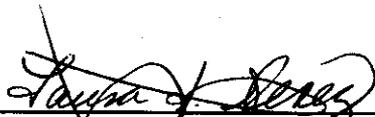
Asesor: Dr. Manuel A. Castillo Rivera.

Asesor: Dr. David M. Díaz Pontones.

México D.F. 13 de Junio 2005

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobaron la presente tesis el día 13 de Junio de 2005.

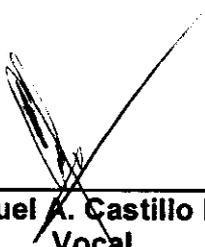
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



Dra. Laura J. Pérez Flores.
Presidente



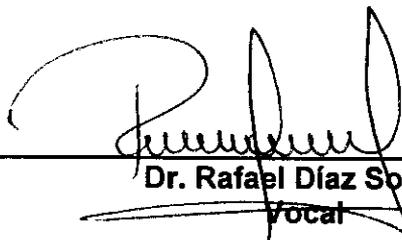
Dra. Clara Pelayo Zaldívar.
Secretario



Dr. Manuel A. Castillo Rivera.
Vocal



Dr. David M. Díaz Pontones.
Vocal



Dr. Rafael Díaz Sobac.
Vocal

México. D. F. a 13 Junio de 2005