

SISTEMA ENZIMÁTICO ANTISENESCENCIA, CATALASA-SUPERÓXIDO DISMUTASA, DE FRUTOS DE PITAHAYA (*Hylocereus undatus*) ALMACENADOS CON FRÍO

R. Balois-Morales^{1¶}; M. T. Colinas-León²;
C. B. Peña-Valdivia¹; S. H. Chávez-Franco¹;
I. Alia-Tejaca³

¹Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados,
Campus Montecillo, Carretera México- Texcoco, Km. 36.5. Montecillo, Estado de México.
C. P. 56230. MÉXICO. Correo-e: rosendobm@colpos.mx ([¶]Autor responsable).

²Departamento de Fitotecnía, Universidad Autónoma Chapingo.
Km. 36.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. MÉXICO.

³Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos. C. P. 62210. MÉXICO.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar efecto del frío en el sistema enzimático antisenescencia catalasa (EC. 1.11.1.6; CAT)-superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1; SOD) de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) durante el almacenamiento con frío y temperatura ambiente. Lotes de frutos, cosechados en Tehuacán, Puebla, fueron almacenados cuatro días a 22±1 °C, y a 3, 7 y 11±1 °C durante 7, 14 y 21 días, y cuatro días a 22±1 °C al concluir cada período de frigoalmacenamiento. Se determinó la actividad CAT y SOD en la pulpa de los frutos de 20 tratamientos que incluyó un testigo sin almacenamiento. Cuatro días de almacenamiento a 22±1 °C no modificaron la actividad CAT o SOD (18.75 y 3.25 U·g⁻¹, respectivamente), respecto al testigo. El almacenamiento con frío disminuyó significativamente la actividad CAT, respecto al testigo. La inhibición de la actividad CAT no mostró una tendencia dependiente de la temperatura o tiempo de almacenamiento con frío; pero la inhibición media en los frutos almacenados a 11±1 °C (13.07 U·g⁻¹) fue ligeramente menor a la alcanzada con el almacenamiento a 3 y 7±1 °C (12.39 U·g⁻¹). La inhibición de la actividad CAT fue revertida parcial o totalmente con el almacenamiento a 22±1 °C por cuatro días después del frigoalmacenamiento. La actividad SOD no se afectó significativamente con el frío y, en general, fue incrementada con el almacenamiento a 22±1 °C, complementario al frigoalmacenamiento. En respuesta al almacenamiento con frío, la actividad CAT es inhibida, pero SOD, que apoya la disminución de los síntomas de senescencia, generados por el estrés oxidativo, se activa en los frutos de pitahaya.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: estrés, frigoalmacenamiento, senescencia.

ANTISENESCENCE ENZYMATIC SYSTEM, CATALASE-SUPEROXIDE DISMUTASE, IN PITAHAYA (*Hylocereus undatus*) FRUITS STORED AT LOW TEMPERATURES

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the effect of low temperatures on the anti-senescence catalase (EC. 1.11.1.6; CAT)-superoxide dismutase (EC. 1.15.1.1; SOD) enzymatic system of pitahaya (*Hylocereus undatus*) fruit during storage. Groups of fruits from Tehuacan, Puebla, were stored four days at room temperature (22±1 °C), and at 3, 7 and 11±1 °C for 7, 14 and 21 days, and after each cold-storage period they were kept for four days at 22±1 °C. Catalase and SOD activity was evaluated in fruit pulp from 20 treatments, including a control without storage. Four days at 22±1 °C did not modify CAT nor SOD activity (18.75 y 3.25 U·g⁻¹, respectively) compared with the control. Cold storage significantly diminished CAT activity, relative to the control. Inhibition of CAT activity was not dependent on cold storage temperature or time, but mean inhibition in fruits stored at 11±1 °C (13.07 U·g⁻¹) was slightly lower than at 3 and 7±1 °C (12.39 U·g⁻¹). After cold storage, CAT inhibition was partially or totally reverted after four days of storage at 22±1 °C. SOD activity was not significantly affected by low temperatures, and in general, after cold storage, it was activated with complementary storage at 22±1 °C. CAT activity is inhibited by cold storage, but SOD activity, which diminishes the process of senescence generated by oxidative stress, is activated in the pitahaya fruits.

ADDITIONAL KEY WORDS: stress, cold-storage, senescence.

INTRODUCCIÓN

Los frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) son considerados exóticos por su sabor y aroma exquisito (Rodríguez, 2000), color atractivo de su cáscara y probablemente, también por la oferta reducida de ellos en el mercado, tanto nacional como internacional.

El uso de frío durante el manejo postcosecha de frutos tropicales, como *H. undatus*, mantiene su calidad, pues disminuyen su metabolismo y prolonga la vida de anaquel. Aunque, las temperaturas bajas retardan la senescencia, se ha señalado que los frutos de algunas especies con origen tropical y subtropical son notablemente sensibles al frío, por lo que la temperatura de almacenamiento puede causar daños, deteriorar el tejido y disminuir el valor comercial (Alia-Tejagal *et al.*, 2000; Wismer, 2003). El oscurecimiento del tejido puede acelerarse durante el almacenamiento con frío y es una de las causas principales de las pérdidas durante la poscosecha. El oscurecimiento desarrollado en estas condiciones ha sido relacionado con la acción de la polifenol oxidasa (EC. 1.14.18.1; PFO) y peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POD), sobre los fenoles, mientras que los eventos que conducen a la senescencia de los tejidos y la necrosis en los frutos se han vinculado con la formación y acción de las denominadas especies reactivas de oxígeno (radicales superóxido, oxígeno "singlete", radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno).

La maduración y senescencia pueden ser consideradas como fenómenos oxidativos, activados al inicio de la senescencia; así, la actividad SOD y de otras enzimas, como CAT disminuye y el superóxido o peróxido de hidrógeno, podrían acumularse hasta niveles tóxicos para las células, y desarrollar daños irreversibles en los tejidos (Masia, 1998). Por lo que, si al menos una de las enzimas está activa, existe la posibilidad de que los daños de la senescencia en los frutos se retarden. Con relación a esto, experimentalmente se ha demostrado la conveniencia de cuantificar la actividad de algunas enzimas, como CAT y SOD, que catalizan las reacciones que disminuyen las concentraciones de las especies reactivas de oxígeno, que en el caso de los frutos de origen tropical y subtropical es incrementada por el frío, durante el almacenamiento (Lafuente y Sala, 2000; Aquino-Bolaños y Mercado-Silva, 2004; Baquero *et al.*, 2005).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del frío en el sistema enzimático antisenescencia CAT - SOD de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) durante el almacenamiento con frío y temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron frutos de pitahaya cosechados en el Valle de Tehuacán, Puebla, en septiembre de 2004, con un índice de cosecha Grado III de acuerdo con la clasificación de Centurión *et al.* (2000), se colocaron en cajas de polietileno,

con capacidad para 20 kg (previamente desinfectadas) y se transportaron al laboratorio, en un tiempo de 20 horas. En el laboratorio, los frutos fueron seleccionados y se descartaron aquellos con daños. Al final se obtuvo una muestra de 170 frutos, que se separó en cinco lotes. Uno fue analizado inmediatamente y fue considerado testigo sin almacenamiento. Los otros cuatro fueron almacenados a 3 ± 1 °C, 7 ± 1 °C, 11 ± 1 °C y temperatura ambiente (22 ± 1 °C); los lotes almacenados con frío fueron muestreados a los 7, 14 y 21 días y una parte de esas muestras se mantuvo a temperatura ambiente, por cuatro días, y otra fue analizada en ese momento. El lote de almacenamiento a 22 ± 1 °C se analizó después de cuatro días; similarmente, las muestras transferidas a temperatura ambiente, después del almacenamiento con frío, se analizaron después de cuatro días. Así, se generaron 20 tratamientos.

El diseño experimental fue un completamente al azar, con cinco repeticiones y un fruto como unidad experimental. El análisis estadístico incluyó ANOVA, y comparación múltiple de medias mediante el método de la prueba de Tukey a una $P \leq 0.5$ y fue realizado con el paquete estadístico SAS (SAS, 2000).

Evaluaciones

Catalasa (EC. 1.11.1.6; CAT)

La actividad de la catalasa se evaluó con el método descrito por Blackwell *et al.* (1990), con modificaciones. La enzima se extrajo a partir de 2 g de pulpa fresca con 5 mililitros de solución extractora Trizma HCl (triz-HCl) fría, 10 mM (pH 8.5) que contenía 1 % de polivinil pirrolidona (PVP), la pulpa en la solución triz-HCl se trituró durante 30 segundos en un homogeneizador de tejidos y luego se centrifugó durante 20 minutos a $10\,000 \times g$ a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para determinar el cambio de absorbancia en 2.83 minutos, a 240 nm en un espectrofotómetro digital. La actividad enzimática se evaluó en un volumen total de tres mililitros, de los cuales 2.8 fueron del amortiguador triz-HCl 10 mM (pH 8.5), 0.1 de peróxido de hidrógeno al 88 % (en agua destilada v:v) en triz-HCl 100 mM y 0.1 del sobrenadante. El ensayo se realizó a temperatura de entre 20 y 22 ± 1 °C. La actividad enzimática se presenta en unidades internacionales por gramo de peso fresco de tejido ($U \cdot g^{-1}$), cada unidad de actividad enzimática representa la descomposición de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de H_2O_2 .

Superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1; SOD)

La actividad de SOD se evaluó con el método propuesto por Beyer y Fridovich (1987) con modificaciones. La enzima se extrajo a partir de dos gramos de pulpa fresca con cinco mililitros de solución extractora (amortiguadora de fosfatos) 0.1 M (pH 7.8). La pulpa en solución amortiguadora se trituró durante 30 segundos, con un homogeneizador de tejidos; luego, la mezcla se centrifugó durante 20 minutos a $12\,500$

x g a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para evaluar el cambio de absorbancia en 2.83 minutos a 560 nm en el espectrofotómetro digital. A tres mililitros de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.8 [con EDTA 0.01 mM, 3.66 ml de L-metionina, 2.44 ml de NBT y 1.83 ml de Triton X-100 en un volumen final de 66 ml] se les adicionó 0.5 ml del sobrenadante y 0.03 ml de riboflavina, esta mezcla de reacción se iluminó durante siete minutos con una lámpara con luz fluorescente de 20 watts Grolux y se procedió a leer la absorbancia. El ensayo se realizó a temperatura de entre 20 y 22 ± 1 °C. El incremento de la absorbancia, debido a la formación de azul de nitro tetrazolium formazan por unidad de tiempo determina la velocidad de reacción. La actividad enzimática es presentada en unidades internacionales por gramo de peso fresco (U·g⁻¹), cada unidad de SOD es igual a la cantidad del sobrenadante que fotoinhibe la formación de 50 % de azul de nitro tetrazolium formazan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad CAT y SOD se mantuvo sin cambio significativo después de cuatro días de almacenamiento a 22 ± 1 °C (Cuadro 1). Este resultado indica que ambas enzimas son notablemente estables durante los primeros días de la postcosecha, en los frutos de pitahaya a temperatura ambiente. La estabilidad de la actividad de CAT en los frutos almacenados a 22 ± 1 °C contrasta con lo observado en frutos de mamey (*P. sapota*) por Alia *et al.* (2005), quienes determinaron que durante el cambio de madurez fisiológica a madurez de consumo, a 20 °C por 12 días, la actividad CAT se incrementó significativamente. Estas diferencias pueden ser dependientes de la especie, momento fisiológico de cosecha, tiempo de almacenamiento, entre otros factores.

El almacenamiento con frío disminuyó significativamente la actividad CAT, respecto a los frutos recién cosechados. El almacenamiento a 3 ± 1 °C (durante 14 días) generó la máxima inhibición de todos los tratamientos (mayor al 50 %) de la actividad CAT de los frutos (Figura 1). La inhibición de la actividad CAT no mostró una tendencia dependiente de la temperatura o tiempo de almacenamiento con frío; pero la inhibición media en los frutos almacenados a 11 ± 1 °C (13.07 U·g⁻¹) fue ligeramente menor a la alcanzada con el almacenamiento a 3 y 7 ± 1 °C (12.39 U·g⁻¹). La inhibición de la actividad CAT por el frío puede estar asociada al proceso

de senescencia, con la consecuente acumulación de especies químicas reactivas, como O₂⁻ y H₂O₂, que propician el incremento de los síntomas del denominado estrés oxidativo.

La CAT es una enzima antioxidante involucrada en los mecanismos de protección contra el estrés por frío en los frutos, como la mandarina (Lafuente y Sala, 2000). Los frutos de pitahaya almacenados a 7 ± 1 °C durante 7, 14 y 21 días no mostraron una variación significativa en la actividad CAT, inclusive cuando fueron transferidos a temperatura ambiente, su actividad enzimática fue similar entre los tratamientos (Figura 1 B). En contraste, la actividad CAT si mostró tendencia a aumentar en los frutos transferidos a temperatura ambiente por cuatro días después de ser almacenados con frío durante el período más prolongado, el de 21 días (Figura 1 B).

La actividad de la SOD se afectó poco con el frío durante el almacenamiento; al contrario, el almacenamiento a 11 ± 1 °C incrementó significativamente la actividad de esta

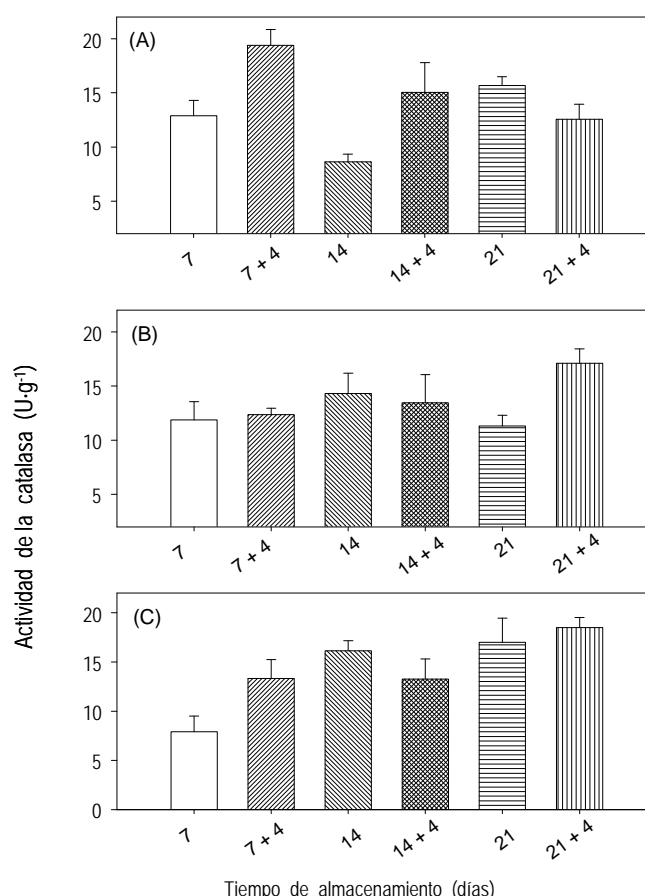


FIGURA 1. Actividad de la catalasa en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados a 3 ± 1 °C (A), 7 ± 1 °C (B) y 11 ± 1 °C (C), por siete, 14 y 21 días y transferidos a 22 ± 1 °C, por cuatro días. Las líneas sobre las barras indican el error estándar (n=4). La actividad al inicio del almacenamiento y después de cuatro días a 22 ± 1 °C, sin refrigeración previa, fue 19.51 y 18.75 U·g⁻¹, respectivamente.

CUADRO 1. Actividad de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados a temperatura ambiente (22±1 °C).

Período de almacenamiento (días)	Catalasa (U·g ⁻¹)	Superoxidasa dismutasa (U·g ⁻¹)
0	19.51 a	3.57 a
4	18.75 a	3.25 a

Valores seguidos con la misma letra, en el sentido de las columnas, indican semejanza según la prueba de Tukey a una P≤0.05.

enzima. En general, la transferencia de los frutos a la temperatura ambiente, almacenados previamente con frío, incrementó la actividad de la SOD (Figura 2). Estos resultados indican que en respuesta al almacenamiento con frío, al menos una de las enzimas que apoyan la disminución de los síntomas de senescencia, activados por el estrés oxidativo, se activa en los frutos de pitahaya.

La maduración y senescencia son procesos bioquímico-fisiológicos naturales de los frutos, pero pueden ser acelerados por diversos factores, y ambos incluyen procesos oxidativos; estos, son activados notablemente al inicio de la senescencia. Así, durante la senescencia la actividad SOD y otras enzimas, como CAT disminuye, el superóxido o peróxido de hidrógeno son acumulados hasta niveles tóxicos para las células y se desarrollan daños irreversibles en los tejidos (Masia, 1998). Por lo que, si al menos una de las enzimas está activa, podrían retardarse los daños de la senescencia en los frutos. Los resultados del presente estudio refuerzan la idea de que la evaluación de la actividad SOD y

CAT en un mayor número de variantes de pitahaya podría ayudar a seleccionar aquellas que toleren mayormente el almacenamiento postcosecha con frío y en consecuencia con mayor potencial de comercialización.

CONCLUSIONES

El almacenamiento de los frutos de pitahaya a 22 ± 1 °C, durante cuatro días, no modifica significativamente la actividad del sistema enzimático anti-senescencia, representado por CAT y SOD. Sin embargo, el mismo sistema anti-senescencia es afectado parcialmente por el frío durante el almacenamiento, pues la actividad CAT es significativamente sensible al frío. La inhibición de la actividad CAT se incrementa con las temperaturas menores, y es parcialmente revertida con la transferencia de los frutos a la temperatura ambiente.

En contraste con la actividad CAT, la actividad SOD es insensible al frío durante el almacenamiento de los frutos. En respuesta al almacenamiento con frío, al menos una de las enzimas (SOD) que apoyan la disminución de los síntomas de senescencia, generados por el estrés oxidativo, se activa en los frutos de pitahaya.

LITERATURA CITADA

- ALIA, TEJACAL, I.; COLINAS LEÓN, M. T.; MARTÍNEZ DAMIÁN, M. T.; SOTO, H. M. R. 2005. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore and Stearn) II: Cambios en fenoles totales y actividad enzimática. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 28(1): 25-32.
- ALIA-TEJACAL, I.; SAUCEDO-VELOZ, C.; MARTÍNEZ-DAMIÁN, M. T.; COLINAS-LEÓN, M. T. 2000. Temperaturas de almacenamiento y maduración en frutos de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn). Rev. Chapingo serie Horticultura 6(1): 73-78.
- AQUINO-BOLAÑOS, E. N.; MERCADO-SILVA, E. 2004. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. Postharvest Biology and Technology 33: 275-283.
- BAQUERO, D. L. E.; CASTRO, R. J. A.; NARVÁEZ, C. C. E. 2005. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. Acta Biológica Colombiana 10: 49-59.
- BEYER, W. F.; FRIDOVICH, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Anal. Biochem. Biochem. 161: 559-566.
- BLACKWELL, R. D.; MURRAY, A. J. S.; LEA, P. J. 1990. Enzymes of photorespiratory carbon pathway. In: Methods in Plant Biochemistry. P. J. Lea (ed). Academic Press. USA. pp. 129-144.
- CENTURIÓN, Y. A.; PÉREZ, R. V.; SOLÍS, P.; BÁEZ, S. R.; MERCADO, S. E.; SAUCEDO, V. C.; SAURI, D. E. 2000. Crecimiento, desarrollo y comercialización de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) durante la postcosecha. Rev. Iber. Hort. Mex. 7(3): 419-425.
- LAFUENTE, M. T.; SALA, J. M. 2000. Catalasa enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. Postharvest Biology and Technology 20:81-89.

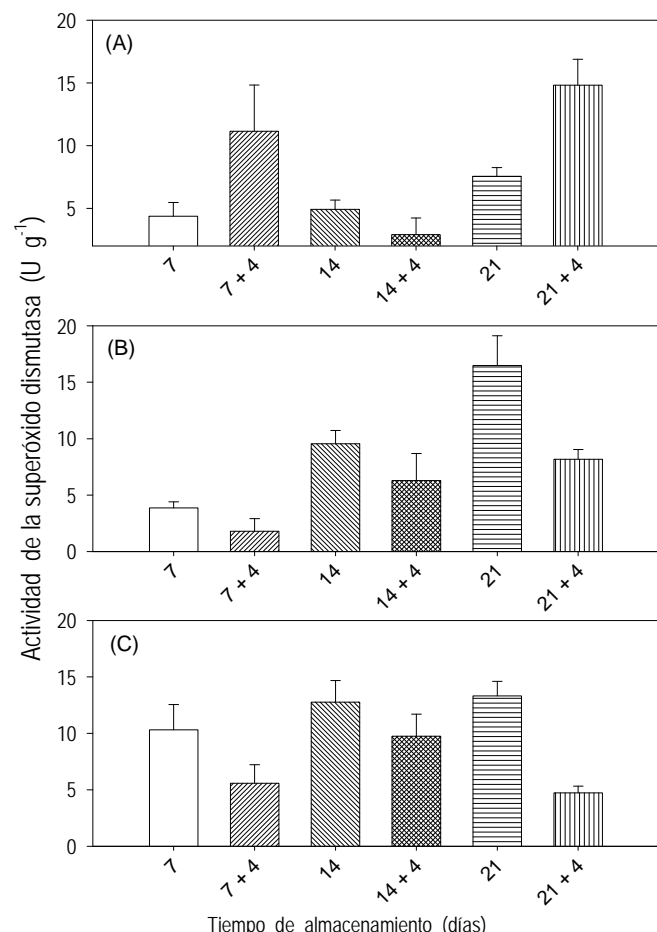


FIGURA 2. Actividad de la superóxido dismutasa en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados a 3 ± 1 °C (A), 7 ± 1 °C (B) y 11 ± 1 °C (C), por siete, 14 y 21 días y transferidos a 22 ± 1 °C, por cuatro días. Las líneas sobre las barras indican el error estándar (n=4). La actividad al inicio del almacenamiento y después de cuatro días a 22 ± 1 °C, sin refrigeración previa, fue 3.57 y 3.25 U·g⁻¹, respectivamente.

- MASIA, A. 1998. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiol. Plant.* 104: 668-672.
- SAS. 2000. SAS. User's guide: statistics. Versión 8.1. SAS. Institute Inc. Cary, NC. USA. 1290 p.
- WISMER, W. V. 2003. Low temperature as a causative agent of oxidative stress in postharvest crops. pp. 55-68. *In*: HODGES M., D. (ed). *Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops*. Food Products Press. New York.