



Manzanas

El paradigma

A pesar de todos los conocimientos generados por la investigación desde hace casi cinco décadas, los mecanismos bioquímicos y las bases genéticas que producen el escaldado superficial son aún desconocidos y, para muchos, este desorden fisiológico representa un verdadero paradigma.

Uno de los desórdenes fisiológicos más estudiados en manzanas y peras es el escaldado superficial. Éste es una limitante para almacenajes prolongados de pomáceas especialmente para el mercado fresco, debido a que afecta la apariencia, calidad y valor de la fruta, incidiendo en la comercialización del producto en el mercado. Dentro de las variedades susceptibles de gran importancia económica para Chile se encuentran: Granny Smith, Red Delicious y Fuji en manzanas; y en peras: Anjou, Packham's Triumph y Bartlett.

El escaldado superficial se manifiesta con manchas de color café sobre la superficie de la piel, producto de una necrosis del tejido hipodérmico. Generalmente no se expresa en almacenaje, a temperatura de 0° C, sino sólo cuando la fruta es expuesta a madurar a alta temperatura (Figura 1). Las causas del daño se describen ampliamente en la literatura como la oxidación del compuesto α -farneseno, un hidrocarburo sesquiterpeno acíclico (C₁₅H₂₄), que

se encuentra en la superficie de manzanas y peras, siendo no detectable durante el preclimaterio a la cosecha, que se va acumulando en mayor proporción en la piel de los frutos durante la maduración y el almacenaje a bajas temperaturas.

Los productos oxidados del α -farneseno, descritos como trienos conjugados (CTs), se encuentran bajo los rangos de absorción ultravioleta 259, 269 y 281 nm y corresponden a hidroperóxidos intermediarios que se acumulan progresivamente en la superficie de los frutos almacenados y serían los responsables del daño a nivel celular, a través de un proceso en cadena de radicales libres. El desarrollo de escaldado superficial se ha correlacionado positivamente con la concentración de CTs y especialmente con el CT 281, más que con el α -farneseno.

A pesar de todos los conocimientos generados por la investigación desde hace casi cinco décadas, aún los mecanismos bioquímicos y las bases genéticas

¹ Investigadora Asociada Departamento de Fruticultura y Enología
² Profesor Departamento de Fruticultura y Enología

del escaldado superficial

Carolina Contreras ¹ / cdcontr1@uc.cl
Juan Pablo Zoffoli ² / zoffolij@uc.cl

que producen el escaldado superficial son desconocidos y, para muchos, este desorden fisiológico representa un verdadero paradigma. Algunos hitos en la historia de la investigación de este desorden se remontan al año 1968 cuando se aisló e identificó por primera vez el compuesto α -farneseno. A partir de este estudio, en 1969, se pudo disponer de los compuestos de la oxidación de α -farneseno e inducir el daño de escaldado en manzanas, concluyendo que los trienos conjugados eran los causantes directos del desorden. Pero no fue hasta 1995, cuando se logró identificar, desde manzanas algunos de los compuestos oxidados del α -farneseno: los isómeros de 9E y 9Z del 2,6,10-trimetil-dodeca-2,7,9,11-tetraen-6-ol.

El paradigma del escaldado superficial hoy se basa en una teoría centrada en la biosíntesis y oxidación del α -farneseno, el cual se autooxida generando una reacción en cadena con otros compuestos de la célula. El resultado de esta reacción son hidroperóxidos de variada naturaleza química (trienos conjugados), que

aumentan la permeabilidad de la célula y producen el síntoma de pardeamiento característico. El daño se localiza en las células de la hipodermis.

Estrés oxidativo y daño por frío

En los últimos años se han planteado otras líneas de pensamiento para explicar el mecanismo de desarrollo de escaldado superficial, por ejemplo:

- 1) El escaldado superficial ocurre si los sistemas antioxidantes dentro de la hipodermis son sobrepasados por el estrés oxidativo generado por una célula dañada, el cual oxida a α -farneseno causando un incremento en los niveles de metabolitos tóxicos.
- 2) α -farneseno y sus metabolitos tóxicos no son los causantes directos del escaldado, pero ocurriría escaldado si la capacidad antioxidante de las células hipodermales es dañada por el estrés oxidativo.
- 3) El escaldado superficial no sería más que la expresión de un típico daño

por frío debido a la relación tiempo-temperatura. Sin embargo, el daño por frío está asociado al mecanismo de daño celular causado por un daño oxidativo, el cual cae dentro de los puntos 1 y 2 anteriormente descritos.

Estas teorías también se relacionan con la oxidación del α -farneseno toda vez que este compuesto participa del daño a través de un proceso auto-oxidativo. A diferencia de la teoría establecida, estas teorías complementarias no están basadas en observaciones consistentes o estudios que prueben la capacidad antioxidante del fruto para contrarrestar el desarrollo de escaldado superficial, ya que básicamente se propone un desbalance entre la capacidad antioxidante del fruto y la generación de radicales libres que producen el daño. Algunos estudios han evaluado la acumulación de peróxidos y productos de peroxidación lipídica, en relación a la actividad antioxidante de algunas enzimas (superóxido dismutasa,



Figura 1. Escala de escaldado superficial: leve, moderado y severo.

peroxidasa, catalasa, etc.) que detoxifican especies reactivas de oxígeno en variedades de manzana susceptibles y resistentes a escaldado. Sin embargo, no se han encontrado cambios significativos en la actividad enzimática ni en los niveles de detoxificación en frutos con desarrollo de escaldado.

Una teoría reciente está relacionada con los compuestos oxidados del α -farneseno (compuestos MHOs), pero de naturaleza volátil, es decir, una quetona conocida como 6-metil-5-hepta-2-ona (MHO) que en condiciones de escasa ventilación causaría el daño típico de escaldado superficial. Se ha comprobado que aplicaciones exógenas del compuesto MHO aumentan la expresión de escaldado. Por otro lado, la concentración de MHO aumenta entre un 20 por ciento y un 60 por ciento más, en tejidos que están desarrollando escaldado y que ya están severamente dañados, respectivamente. Sin embargo, una producción natural de MHO por sí sola es insuficiente para desarrollar escaldado. Aún faltan estudios en esta materia.

Líneas de investigación y manejo

Por cerca de 40 años la industria de la manzana ha controlado el escaldado superficial mediante la aplicación prealmacenaje del antioxidante DPA, el cual retarda la autooxidación de α -farneseno. Un aspecto negativo del DPA es que deja residuos en la fruta, por esta razón se han buscado méto-

dos alternativos de control de escaldado desarrollándose así, distintas líneas de investigación:

- **1-MCP.** 1-Metilciclopropeno es un bloqueador de los receptores de etileno. Disminuye la producción de etileno y, reduce la producción de farneso y trienos conjugados por lo tanto, previene el desarrollo de escaldado superficial. Sin embargo, se desconoce si inhibe directamente las enzimas responsable de la síntesis de farneseno. A la fecha, desde que se desarrolló en el año 1996, probablemente es el mejor producto que controla escaldado y la mejor alternativa como reemplazo el DPA en la industria frutícola, por la nula residualidad en la fruta.
- **Tratamientos térmicos.** Desde los años cincuenta se han estudiado los efectos de estos tratamientos para disminuir la incidencia del desorden. El fundamento de los tratamientos térmicos se basó en que la acumulación de α -farneseno y sus CTs necesitaban un proceso de síntesis regulado por enzimas, así un calentamiento a los frutos previo o durante almacenaje inhibiría la síntesis de este sistema. Se han investigado tratamientos térmicos (inmersión en agua caliente a 52°C, 4 días a 38°C, etc.) con diferentes resultados, obteniendo una menor incidencia de escaldado superficial debido a que disminuyen los niveles de α -farneseno y CTs en frutos acondicionados. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes, ya

que, luego de un tiempo de almacenaje, el efecto se pierde y además genera severos daños por alta temperatura como, por ejemplo, pardeamiento externo y amarillez. Hasta ahora, no se conoce un protocolo de tratamiento térmico que permita un buen acondicionado sin efectos detrimentales. Los más promisorios propuestos se basan en atraso de enfriamiento que tienen efectos en acelerar la senescencia limitando el tiempo de conservación a tres o cuatro meses. El protocolo de enfriamiento de 3°C por 30 días y enfriamiento lento hasta 1°C, está siendo utilizado comercialmente en Granny Smith para aumentar la resistencia de la fruta a este desorden.

- **Atmósfera ultrabaja de oxígeno y atmósfera controlada.** Estas dos tecnologías a pesar de contribuir enormemente a la disminución del desorden, también presentan diferentes resultados dependiendo de la variedad. Además de ser sistemas al límite de la anaerobiosis, son difíciles de implementar con seguridad y uniformidad, aunque en el último tiempo nuevas tecnologías de análisis de condiciones aflitivas han permitido el uso de esta técnica en forma comercial.

Síntesis de farneseno y su regulación genética

Se sabe que la síntesis de α -farneseno en la piel de manzana ocurre principalmente por la vía del ácido mevalónico (vía isoprenos, Figura 2).

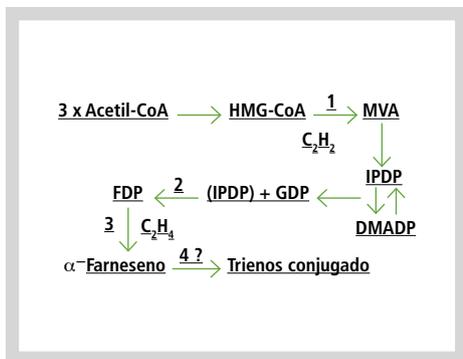


Figura 2. (Adaptado de Whitaker, B., 2004).

Esquema simplificado de la vía de síntesis de α -farneseno.

(1): HMGR, Hidroximetilglutaril-CoA reductasa, gen regulado por etileno.

(2): FDP, Farnesil difosfato sintasa, gen no regulado por etileno.

(3): α -FS, α -Farneseno sintasa, gen regulado por etileno.

(4): ?, desconocida.

MVA: Ácido mevalónico; IPDP: Isopentenil difosfato; DMADP: dimetilalil difosfato

GDP: geranil difosfato; FDP: Farnesil difosfato.

A partir del año 2000 comienzan los primeros estudios en el aislamiento de enzimas involucradas en las síntesis α -farneseno en manzana.

Se comenzó clonando total o parcialmente genes de hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) (1) que pertenecen a una pequeña familia de genes, denominados *HMG1*, *HMG2*, *HMG3* obteniendo regiones de cDNA en variedades comerciales de manzana como *Delicious*, *Granny Smith* y *Law Rome*.

También un cDNA completo de manzana de la enzima farnesil difosfato sintasa (FDP) (2) ha sido clonado de la piel de *Granny Smith*.

El último paso para la síntesis de α -farneseno es a partir del sustrato farnesil pirofosfato, el cual es catalizado por la enzima α -farneseno sintasa (α -FS) (3). Esta última enzima ha sido caracterizada y purificada parcialmente. Se ha obtenido el cDNA del gen *AFSI*, en *Delicious* y *Law Rome*, y también se ha determinado su actividad en la síntesis del compuesto, transformándose en la enzima blanco-específica para inhibir la producción α -farneseno. También en peras *D'Anjou* se ha identificado el gen *PcAFSI*.

A la fecha ya se ha demostrado que el etileno está involucrado en la síntesis de α -farneseno, mediante la regulación de los genes de las enzimas (1) y (3). Se comprobó también que el 1-MCP logra disminuir la biosíntesis de α -farneseno mediante la disminución de transcritos de *AFSI* en *Granny Smith*.

La enzima ? (4) aún desconocida y cuya actividad sería reductasa, estaría involucrada en la acumulación de CTols que corresponden a formas reducidas de los hidroperóxidos CTs. Aunque no se sabe cómo ocurriría esta reducción, esta enzima podría ser un factor que controle la acumulación de CTols en diferentes cultivares de manzana.

Consideraciones finales

A pesar de todos los esfuerzos biotecnológicos para dilucidar la ontogenia del escaldado superficial, aún persisten incógnitas como, por ejemplo, la naturaleza del pardeamiento del escaldado. Se ha hipotetizado que se debería a la oxidación de lípidos de membrana de las células epidermales e hipodermas, seguido de la polimerización de polifenoles.

También es sabido que los niveles de trienos conjugados se correlacionan bien con el desarrollo de escaldado. Sin embargo, a través de años de estudio, se han encontrado algunas inconsistencias especialmente en el caso de la medición efectuada a través de la absorción 281.

1) Hacia principios de los noventa ya existen las primeras evidencias de que no siempre esta correlación se cumple, pues algunos autores descubrieron que a pesar de que los niveles del CT281 no aumentaban o se mantenían estables, el escaldado superficial sí aumentaba.

2) En cosechas más tardías (que expresan menor incidencia del desorden) o

en variedades escaldado-resistentes, se han encontrado que los niveles de CT281 son bastante altos y aún así no expresan escaldado.

3) Manzanas con distintas intensidades de escaldado superficial, de una misma cosecha y con el mismo tiempo de almacenaje, tienen concentraciones del CT281 similares.

En los últimos años se ha postulado que los CTs, al no indicar necesariamente escaldado, quizás estarían ligados a otros procesos fisiológicos. Así se ha visto que el CT258 estaría ligado a un antioxidante fenólico en la piel de manzana.

Lo cierto es que hoy la única forma de prevenir eficientemente, sin efectos colaterales, el desarrollo de escaldado superficial en frutos es mediante el uso de productos químicos, principalmente DPA y 1-MCP. Asimismo, es probable que no se logre en un futuro cercano comprobar el paradigma del escaldado superficial, pero al menos los avances moleculares permitirán a corto plazo obtener manzanas genéticamente modificadas que inhiban la síntesis de α -farneseno y de esta forma disminuir la aplicación de productos químicos y prolongar la vida en poscosecha de manzanas susceptibles a escaldado superficial.