

ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS E INDICES DE INSATURACION DURANTE LA MADURACION DE FRUTOS DE CHIRIMOYO (Annona cherimola Mill)

M. Gutiérrez, M.M. Sola, L. Pascual\*, F. Perfeccti\* y A.M. Vargas  
Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y \*Genética.  
Universidad de Granada. Granada. Spain

Abstract

We have studied chirimoya lipid composition during ripening. Major fatty acids are palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic. Linoleic acid accumulates the third day after harvesting, decreasing below harvesting levels at the onset of senescence. Phospholipids concentration in mesocarp decrease after six days of ripening, while free fatty acids and esterified sterols accumulate.

Resumen

Los frutos de chirimoyo almacenados a 22°C sufren un proceso de maduración muy rápido que les lleva a la senescencia en un periodo de seis días. Durante este tiempo se producen cambios sustanciales en la composición de ácidos grasos, especialmente en la fracción fosfolipídica. Esta fracción disminuye su concentración, mientras que los ácidos grasos libres y los esteroides esterificados la incrementan al final de la maduración. Estos cambios están relacionados con la biosíntesis de hormonas vegetales y con el deterioro progresivo de las membranas, que tiene lugar durante la maduración de los frutos.

Introducción

Los frutos del chirimoyo (Annona cherimola Mill.) presentan un patrón de maduración típicamente climaterico caracterizado por un pico en la producción de etileno, que produce una rápida senescencia (Lahoz et al., 1990). Durante los procesos de senescencia en los tejidos vegetales y en la maduración de los frutos se produce una pérdida progresiva de la integridad de las membranas de una forma diferenciada. Estudios microestructurales muestran una evidencia clara del deterioro progresivo de orgánulos y membranas (Gutiérrez et al., 1992).

Se ha propuesto que los cambios en la proporción y composición de esteroides en membranas de células vegetales desempeñan un importante papel en los procesos de senescencia y maduración, alterando las propiedades físicas de la matriz lipídica y, consecuentemente, la actividad de las enzimas asociadas a membranas (Lurie and Ben-Arie, 1983; Thompson et al., 1982). Así mismo se ha observado que en el proceso de maduración de varios frutos se produce una disminución en la fluidez de membranas (Brady, 1987). Cambios notables tanto en el contenido como en la composición de los esteroides tienen lugar durante la maduración de tomates (Chow and Jen, 1978; Whitaker, 1988). Los esteroides son componentes estructurales de las membranas que pueden constituir una importante proporción del total de lípidos en las membranas plasmáticas de células vegetales (Lynch and Steponkus, 1987).

Los radicales libres también están implicados en los fenómenos de senescencia y maduración de frutos (Wang and Baker, 1979), pudiendo producir reacciones de peroxidación de lípidos de membrana y desesterificación de ácidos grasos (Niehaus, 1978). Estos fenómenos alteran la integridad de las bicapas lipídicas, favoreciendo la acción de las fosfolipasas lo que conduce a una pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas.

#### Material y métodos

Frutos de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill. cv Fino de Jete) se obtuvieron de cultivares en Jete (Granada). Inmediatamente después de la recolección los frutos de un peso de (300 g  $\pm$  20 g) fueron desinfectados sumergiéndolos en una disolución al 0'2% (v/v) en Deccosol durante 1 min seguido de un lavado en otra disolución que contenía Imazalyl al 0'05% (p/v) y Deccosol al 0'2%, para evitar posibles infecciones fúngicas. Una vez secos, los frutos fueron introducidos en cámaras termostatizadas a 22°C, con una humedad relativa en torno al 90%. Un mínimo de seis frutos fueron analizados los días 0, 3 y 6 tras la recolección. Los análisis se realizaron por duplicado .

La extracción de lípidos se ha realizado siguiendo básicamente el método descrito por Folch (1957), en el que se han introducido algunas modificaciones. Un gramo de tejido se homogeneizaba en una mezcla de cloroformo:metanol:ácido clorhídrico (200:100:1 en volumen) y BHT al 0'005%. El tiempo de homogeneización fue variable dependiendo de la dureza del mesocarpio, oscilando entre 3 y 12 minutos. Al homogeneizado resultante se añadían 5 ml de ácido clorhídrico 0'1 N, y se agitaba enérgicamente. A continuación se centrifugó a 2800 xg y 4°C durante 10 min. En la fase proteica se realizó una segunda extracción y centrifugación análoga a la anterior. Reunidas las dos fases clorofórmicas se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un baño a 30°C.

La separación de componentes lipídicos se ha realizado por el método de Skipski (1969) con algunas modificaciones. Para el análisis de fosfolípidos totales y de ácidos grasos libres se ha empleado como fase móvil: Hexano:Eter etílico:Acido acético (80:20:1) en volumen, con BHT al 0'005%. Las diferentes bandas aparecidas tras la cromatografía se cuantificaron por fotodensitometría utilizando un fotodensitómetro láser LKB Ultroskan y el programa Gel Scan XL de Pharmacia.

Los ácidos grasos se han metilado con trifluoruro de boro-metanol al 14% de acuerdo con Morrison y Smith (1964) y, posteriormente, se han separado por cromatografía de gases con una columna semi-capilar de 30 m de longitud y 0'5  $\mu$ m de diámetro interno, rellena de una fase estacionaria DB-23 (50% cianopropil polixilano). Como fase móvil se ha utilizado nitrógeno a un flujo de 30 ml/min. La detección se ha realizado con un detector de ionización de llama alimentado con hidrógeno y aire a 30 ml/min y 400 ml/min respectivamente. El programa de temperatura empleado fue el siguiente: una temperatura inicial de 150°C durante 5 minutos, aumentándose a razón de 2°C/minuto hasta alcanzar 190°C y a partir de este valor se elevaba a 220°C a una velocidad de 3°C/min, manteniéndose 4 min a esta temperatura.

La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención de un patrón preparado con los ésteres metílicos de los ácidos grasos disponibles comercialmente y una

solución AGPI nº2 que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos no disponibles comercialmente. También se han identificado inequívocamente por espectrometría de masas.

### Resultados

Se ha estudiado la evolución de los ácidos grasos constituyentes del mesocarpio de chirimoyos en tres momentos distintos de la maduración de los frutos a 22°C. En el momento de la recogida, tres días después, que es el momento en que se inicia la producción masiva de etileno y al sexto día, en que los frutos han completado la maduración y alcanzan la senescencia.

De los 20 ácidos grasos identificados, el conjunto de cinco de ellos, superan el 80% del contenido porcentual total, son los que denominamos mayoritarios: palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico. Los otros quince, se encuentran en proporciones muy pequeñas. Aunque estos ácidos grasos minoritarios pueden desempeñar un papel importante en el control de la fluidez de determinadas membranas o estar directamente involucrados en algunos procesos de la maduración, vamos a ceñirnos en este trabajo a la descripción de la evolución de los ácidos grasos mayoritarios.

Los extractos lipídicos de mesocarpio de los frutos en los diferentes estados de maduración se han separado por cromatografía en capa fina. De todas las fracciones obtenidas nos referiremos a las correspondientes a las de fosfolípidos totales, ácidos grasos libres y esteroides esterificados.

En la fracción de ácidos grasos libres (tabla 1) se observa que no hay cambios porcentuales significativos a lo largo de la maduración, con la excepción de un descenso en el contenido de ácido oléico y un ligero incremento en el de linolénico, que ocurren el día tercero tras la recogida. En la fracción correspondiente a los fosfolípidos totales, (tabla 2) encontramos un patrón semejante pero amplificado. El tercer día se produce un descenso en las proporciones de los ácidos esteárico y oléico y un incremento significativo en los de linoléico y linolénico. Estos cambios revierten al final de la maduración y, en el caso del linoléico, se llega a valores muy inferiores a los iniciales.

Estos cambios son mejor observados al establecer índices (tabla 3). Se puede observar que tanto en las fracciones de fosfolípidos, ácidos grasos libres y esteroides esterificados, los índices entre las diferentes especies lipídicas de 18 carbonos no se modifican, con la excepción del fuerte descenso en la relación linoléico/oléico en los fosfolípidos de frutos maduros.

Por densitometría se ha estudiado el contenido relativo de cada una de las fracciones (Fig. 1) encontrando un descenso significativo en la concentración de fosfolípidos e incrementos en las concentraciones de ácidos grasos libres y esteroides esterificados.

El índice de insaturación calculado como la suma de los porcentajes relativos de cada uno de los ácidos grasos insaturados presente en la muestra multiplicado por el grado de insaturación correspondiente, disminuye en la fracción de fosfolípidos y en la de esteroides esterificados, mientras que aumenta en la de los ácidos grasos libres.

## Discusión

Los cambios en la composición de ácidos grasos en el tercer día tras la recogida deben de estar relacionados con importantes cambios metabólicos que tienen lugar en este momento de la maduración. El acúmulo de ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono puede estar relacionado con su utilización como sustratos o efectores en reacciones implicadas en el proceso de maduración. Se ha descrito que el ácido linoléico puede estar implicado en la biosíntesis del etileno (Yang and Hoffman, 1984) lo que podría explicar su elevada concentración porcentual. También podría estar implicado en la biosíntesis de ácido jasmonico que se ha encontrado esencial en procesos de senescencia de frutos (Vick and Zimmerman, 1987).

No se han aislado orgánulos por lo que no podemos aclarar si los cambios observados podrían estar involucrados en la regulación de la fluidez de determinadas membranas, que podría ser necesaria para el control de la actividad de enzimas oxidativos ligados a membrana, bien de la propia vía biosintética del etileno o como un mecanismo de control de la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa, responsables del incremento en la respiración que ocurre en este día.

Al alcanzar la senescencia, el contenido total de fosfolípidos ha disminuído, confirmando datos sobre la degradación de las membranas previamente publicados. Esta degradación de las membranas se confirma con el incremento de ácidos grasos libres que no provienen de depósitos lipídicos, ya que éstos son muy limitados. Es interesante señalar que, pese a la degradación de membranas, no hay cambios en el índice de insaturación de los fosfolípidos presentes al final del proceso, aunque los ácidos grasos componentes de los esteroides esterificados son menos insaturados.

En resumen, durante la maduración de los frutos del chirimoyo se producen cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, en el metabolismo lipídico, que llevan a la degradación de las membranas típica de la senescencia en muchos frutos (Harwood, 1988; Brady, 1987).

## Referencias

- Brady, C.J. 1987. Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38:155-178.
- Folch J., Lees, B. and Sloane-Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Gutiérrez, M., Sola, M.M., Pascual, L. Rodríguez-García M.I. and Vargas, A.M. (1992) Ultrastructural changes in chilling-injured cherimoya. *Food Struct.* 11:323-332.
- Harwood, J.L. 1988. Fatty acid metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 39:101-138
- Lahoz, J.M., Gutiérrez, M., Martínez-Cayuela, M., Pascual, L. y Vargas, A.M. 1980. Efecto de la refrigeración sobre la maduración del fruto del chirimoyo. *Ars Pharmaceut.* 31:211-216.
- Lurie S. and Ben-Arie, R. 1983. Microsomal membrane changes during the ripening of apple fruit. *Plant Physiol* 73: 636-638.

- Morrison, W. and Smith, L. 1964. Preparation of fatty methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron trifluoride methanol. *J. Lipid. Res.* 5:600-608.
- Niehaus, W.J. 1978. A proposed role of superoxide anion as a biological nucleophile in the deesterification of phospholipid. *Bioorg. Chem.* 7:77-84
- Skipski, V.P. and Barclay, M. 1969. Thin layer chromatography of lipids. In: *Methods in Enzymology*. J.M. Lowenstein, editor. Academic Press, New York. 14:548-550.
- Thompson, J.E. 1988. The molecular basis for membrane deterioration during senescence. In: *Senescence and aging in plants*. (ed. L.D. Noodén and A.C. Leopold) pp. 51-83. Academic Press Inc. San Diego. California.
- Vick, B.A. and Zimmerman, D.C. 1987. Oxidative systems for modification of fatty acids: The lipoxigenase pathway. In, *The Biochemistry of Plants* (P.K. Stumpf ed.) Vol 9, pp. 53-90. Academic Press, London.
- Whitaker, B.D. 1988. Changes in steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry* 27: 3411-3416.
- Yang, S.F. and Hoffmann N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.

Anexo

Tabla 1 - Composición porcentual de ácidos grasos mayoritarios en la fracción fosfolipídica de mesocarpio de frutos de chirimoyo durante la maduración.

D.T.R.	C-16	C-18	C-18:1	C-18:2W6	C-18:2W3
0	28.8±2.1	5.2±0.7	9.3±1.0	24.2±1.9	15.4±1.2
3	36.2±8.9	2.6±0.1	3.3±0.5	29.3±4.5	23.37±4.5
6	29.8±2.4	7.52±.06	11.7±0.9	15.9±1.3	15.4±1.4

Tabla 2 - Composición porcentual de ácidos grasos mayoritarios en la fracción de ácidos grasos libres de mesocarpio de frutos de chirimoyo durante la maduración.

D.T.R.	C-16	C-18	C-18:1	C-18:2W6	C-18:2W3
0	35.5±9.2	7.7±1.5	14.9±2.4	4.1±2.9	3.4±2.8
3	31.9±8.9	7.2±1.8	11.9±2.7	5.8±2.2	4.4±1.8
6	30.2±4.4	8.4±1.0	13.7±1.5	4.1±1.1	2.8±0.8

Tabla 3 - Relaciones entre los ácidos grasos de 18 átomos de carbono e índices de insaturación en algunas fracciones lipídicas de mesocarpio de chirimoyas verdes y maduras.

		C18:1/C18	C18:2/C18:1	C18:3/C18:2	Ind. Insat
PL	VERDES	1.8	2.6	0.6	135
	MADUROS	1.6	1.3	0.8	121
AGL	VERDES	1.9	0.3	0.8	110
	MADUROS	1.6	0.3	0.7	130
EE	VERDES	2.4	0.1	0.2	139
	MADUROS	1.9	0.2	0.2	100

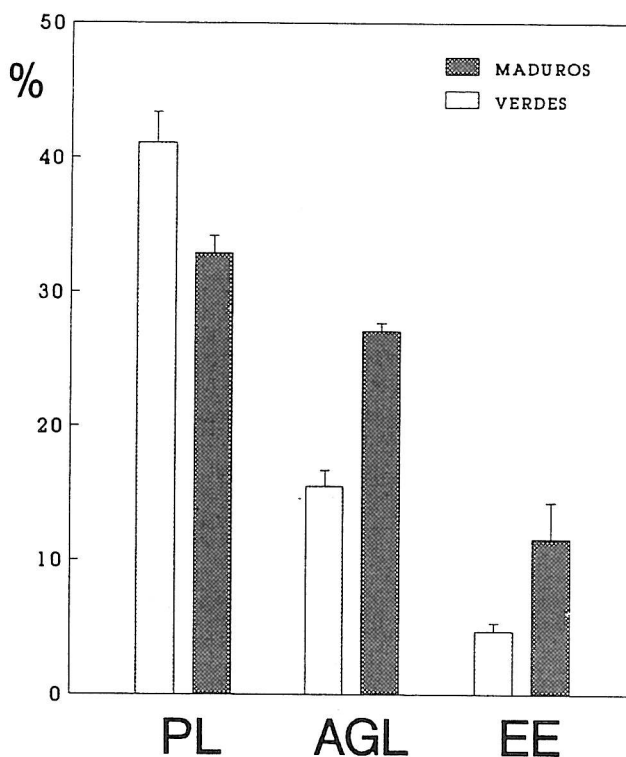


Figura 1 - Concentración porcentual de fosfolípidos (PL), ácidos grasos libres (AGL) y esterol esterificados (EE) en frutos verdes y maduros.





9

ABRIL  
1993

# ACTAS DE HORTICULTURA

Sociedad Española de Ciencias Hortícolas  
Associação Portuguesa de Horticultura

## II CONGRESO IBÉRICO DE CIENCIAS HORTÍCOLAS

ZARAGOZA, 27 al 30 de abril de 1993

COMUNICACIONES/COMUNICAÇÕES

TOMO 1

CULTIVOS ARBÓREOS  
ECONOMÍA  
ORNAMENTALES  
POSTCOSECHA E INDUSTRIAS  
VITICULTURA



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION  
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA AGRARIA Y ALIMENTARIA