



# Aspectos enzimáticos y gasométricos de la respiración del limón

POR EL DOCTOR  
FRANCISCO SABATER GARCIA

## INTRODUCCION

La importancia de los problemas agrícolas, en general, y los de nuestra huerta, en particular, han orientado hacia el campo de la bioquímica vegetal las investigaciones que se realizan en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia. El autor del presente trabajo ha vivido este ambiente desde que consiguió el grado de Licenciado en Ciencias Químicas en 1954 y resulta, por ello, lógico que a la hora de aspirar al grado de Doctor su Memoria esté orientada en este sentido.

Junto con otros frutos, el limón presenta en nuestra huerta un interés grande por el volumen de su cosecha y por tratarse de un producto exportable; por ello hemos intentado con este trabajo iniciar una investigación que conduzca a un mejor conocimiento de la vida de este fruto en su desarrollo, maduración y almacenaje, escogiendo, para ello, el estudio de la respiración, tema demasiado amplio y que, por ahora sólo comprenderá las actividades catalasa y peroxidasa, la capacidad para oxidar el ácido ascórbico y el intercambio respiratorio de los gases oxígeno y dióxido de carbono. A pesar de limitar nuestro trabajo a estos cuatro puntos, por su naturaleza, no es ni puede ser concreto, como hubiéramos deseado, por la gran variedad de factores que observamos pueden influir sobre cada uno de los temas en estudio.

La elección de las actividades catalasa y peroxidasa no obedece a la



posible importancia de dichos enzimas en los procesos metabólicos que tienen lugar en el fruto. Precisamente son enzimas muy estudiados desde el punto de vista teórico y práctico, pero de los que no se sabe mucho sobre el verdadero papel que juegan en el organismo. La razón de su elección consiste en que se trata de catalizadores dependientes del hierro para su actuación y este elemento sí que tiene una importancia decisiva en la vida del fruto. Paralelamente, la oxidación del ácido ascórbico nos ha interesado en cuanto se trata de un fruto con alto contenido en dicha vitamina en todas sus zonas y edades y porque los enzimas capaces de producir dicha oxidación dependen para su actuación del hierro o del cobre. Pensando en este último elemento hemos iniciado la investigación sobre la actividad: fenolasa y ascórbico oxidasa, pero de la primera hemos tenido que desistir en vista de la influencia prácticamente nula del catecol sobre la capacidad para oxidar la vitamina; en cuanto a la segunda estudiaremos y discutiremos hasta qué punto es responsable del metabolismo del ácido ascórbico.

Los estudios gasométricos persiguen un conocimiento de la capacidad general del fruto para respirar en condiciones ordinarias, en atmósfera de nitrógeno y en presencia de algunos inhibidores reales o potenciales.

En todos los casos nuestras medidas buscan la variación de los factores estudiados al crecer y al desarrollarse el fruto y, siempre, comparando cada una de las zonas del mismo.

Desde que el limón adquiere su forma y contextura, lo que consideramos que hace cuando su peso es, generalmente, de 8 a 10 gramos, consta de tres zonas bien definidas:

a) La corteza, o flavedo, donde están contenidos los pigmentos porfirínicos y los sacos donde se guardan los aceites esenciales.

b) El albedo, o parte blanca, de espesor variable con la clase del fruto y con la etapa de su vida.

c) La zona de los carpelos, constituida por sacos donde se almacena el jugo ácido conforme se desarrolla el fruto; estos sacos están rodeados por las membranas carpelares que los aíslan de las zonas exteriores del fruto.

Nosotros estudiaremos aislada y comparativamente el flavedo, el albedo y los sacos y, eventualmente, las membranas carpelares; en cuanto a las etapas del desarrollo y la maduración adoptaremos como criterio en el caso de frutos en desarrollo el peso total del mismo, lo que no deja de ser una aproximación, sobre todo en estados avanzados del desarrollo; como criterio de maduración adoptamos el color de la corteza: verde, verde amarillento, amarillo verdoso, amarillo total reciente y amarillo intenso.

Finalmente realizaremos algunos ensayos dirigidos a profundizar un poco en los procesos que tienen lugar durante el almacenaje, para lo cual, en días determinados tomamos varios frutos recientemente cogidos del árbol por nosotros, procurando la mayor homogeneidad posible de las muestras, y los almacenamos en cajas de madera en atmósfera normal, de forma que este almacenaje se asemeje al que se realiza en la práctica.

Excepto en las tentativas iniciales para poner a punto las técnicas y en los ensayos con frutos aquejados de clorosis, las demás muestras están tomadas todas del mismo árbol, el cual está enclavado en plena huerta de Murcia a un kilómetro de la ciudad y presenta un aspecto completamente normal, produciendo frutos abundantes y sanos.

## ANTECEDENTES

Las investigaciones sobre respiración cubren un amplio campo en los intentos para penetrar en el mecanismo de los procesos biológicos y resulta lógico, puesto que la mayoría de dichos procesos están más o menos relacionados con la respiración. A pesar de ello el término, que en principio no ofrecía complicación puesto que suponía solamente una captura de oxígeno y una cesión de dióxido de carbono, se encontró más difícil de definir conforme se ha ido penetrando en su conocimiento. Aún hoy se presenta varias veces el conflicto de considerar la intensidad de la respiración por la cantidad de oxígeno consumido o por el dióxido de carbono desprendido, la raíz de cuyo conflicto estriba en que el  $\text{CO}_2$  puede originarse por muy diversos caminos, algunos de los cuales no corresponden a la idea actual del proceso respiratorio.

GODDARD (1) define la respiración como la oxidación de compuestos orgánicos por el oxígeno molecular, que sirve como último aceptor de electrones. Ateniéndonos rigurosamente a esta definición deberíamos considerar que en un medio anaerobio los organismos no respiran, cuando, en realidad, sigue siendo general el término «respiración anaerobia». Esta supone un desprendimiento de  $\text{CO}_2$  que en la mayoría de los casos se considera como respiratorio; por otra parte el tomar en consideración el dióxido de carbono desprendido encierra el peligro de considerar como respiratorios todos los procesos de descarboxilación de ácidos orgánicos, lo que en algunos casos está muy lejos de la terminología usual.

Respecto de los métodos empleados para la investigación son muy va-

riados. La célula sigue guardando muchos secretos en cuanto a su estructura íntima y ofreciendo en perspectiva una extraordinaria complejidad por la gran cantidad y diversidad de las sustancias que la componen, junto con factores de tipo físico-químico en los que una ligera variación puede suponer una desviación e, incluso, una inversión de los procesos vitales. Estas circunstancias hacen que el investigador bioquímico se vea obligado a estudiar aspectos muy limitados de lo que sabe es un problema global gigantesco, de tal forma que a la hora de trasladar su problema a la célula viva ha de andar con pies de plomo si quiere extraer deducciones rigurosas y valiosas. Este es el problema de los trabajos más científicos, que se realizan con enzimas con un cierto grado de pureza. Cuando se persiguen resultados más inmediatos los trabajos son menos rigurosos y las conclusiones menos científicas, como es lógico. La literatura abunda en trabajos de este último tipo a pesar de lo cual, resulta un difícil empeño a partir de sus conclusiones llegar a otras de orden superior.

Aunque muchos de los métodos empleados en el estudio de la respiración son de un uso más o menos general, existe infinidad de variantes, cada una de las cuales por su carácter, está destinada a un fin distinto. Por otra parte, dichos estudios se dirigen hacia la presencia y forma de actuar de enzimas y coenzimas, o bien, el estudio más general de los intercambios gaseosos que tiene lugar en el tejido.

No podemos intentar hacer aquí un estudio bibliográfico sobre lo conseguido hasta ahora en el campo de la respiración porque, aun resumiendo, resultaría demasiado amplio.

Concretándonos al caso de las plantas superiores los trabajos de investigación presentan con respecto a los animales la ventaja de la fácil asequibilidad del material a estudiar, pero con el grave inconveniente de carecer, en general, de conjuntos de células con misión específica como ocurre, por ejemplo, con el músculo. Los caminos catabólicos generales de la respiración de las plantas no presentan, por ahora, diferencias serias con respecto a los animales o microorganismos. Los sustratos respiratorios son, en ambos casos, en su mayor parte monosacáridos; sólo en la síntesis de alcaloides, pigmentos y taninos y en la fotosíntesis se nos muestra la planta verdaderamente original. En realidad el almidón es un producto típico de la planta, pero, sin embargo, su uso no difiere mucho del que el animal hace del glucógeno. Quizás la diferencia más fundamental de las plantas con respecto de los animales sea su aparente incapacidad para sintetizar los hidratos de carbono a partir de los ácidos en ausencia de la luz.

El estado actual de nuestros conocimientos sobre la respiración en el reino vegetal puede resumirse así:

**Enzimas respiratorias.**—Se consideran como tales los propios de la fosforilación, los de la ruptura de carbohidratos, deshidrogenasas, oxidadasas y carboxilasas.

Además de éstos, deben considerarse también aquellos que catalizan el paso de electrones de enzima a enzima.

**Sustratos respiratorios.**—Aparte de las sustancias que sufren directamente la oxidación por pérdida de electrones (fosfogliceraldehído, ácido pirúvico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, etc.) se deben considerar también como sustratos los materiales de reserva: polisacáridos, proteínas y grasas. Los hidratos de carbono que actúan de reserva son amilopectina, amilosa, inulina, fructosanas, hemicelulosas, glucósidos y oligosacáridos, tales como rafinosa, sacarosa, estaquiosa, etc.

La relación entre actividad glicolítica y actividad oxidásica es muy variable y de ella nos da una idea el cociente respiratorio y, afinando más, el cociente fermentación/respiración, pero ya hemos hablado de la dificultad de dichos cocientes por la poca seguridad que hay, generalmente, sobre la procedencia del dióxido de carbono desprendido.

Aparte de este inconveniente la presencia o ausencia de oxígeno puede influir y, de hecho, influye en muchos casos sobre la actividad fermentativa, por lo que la medida de  $\text{CO}_2$  desprendido en atmósfera de nitrógeno puede ser que no se corresponda con la observada en presencia del aire. El llamado «efecto Pasteur» se ha intentado definir de muchas formas, de las cuales consideramos más expresiva la de DIXON (2): «la acción del oxígeno en disminuir la destrucción de carbohidratos y suprimir o disminuir la acumulación de productos del metabolismo anaerobio».

No es fácil, a veces, detectar esta acción del oxígeno. Puesto que una molécula de hexosa por fermentación alcohólica da dos de  $\text{CO}_2$  y completamente respirada da seis de  $\text{CO}_2$ , se suele considerar que hay efecto Pasteur cuando la relación  $\text{CO}_2$  fermentativo/ $\text{CO}_2$  respiratorio es mayor que 1/3, lo cual necesita antes asegurar que la fermentación es verdaderamente alcohólica. En realidad este cociente se ha usado para microorganismos; en plantas no tiene tanto significado y por ello se ha empleado más el

$$\frac{\text{CO}_2 \text{ en atmósfera de N}_2}{\text{CO}_2 \text{ en aire}}$$

que no es el mismo que el anterior.

Supongamos el caso siguiente:

	ml. de $\text{O}_2$ consumido	$\text{O}_2$ desprendido
en presencia de aire	a	b
en ausencia de aire	—	c

para la mayoría de los metabolitos al oxidarse totalmente el cociente respiratorio no difiere grandemente de la unidad y es la unidad para los azúcares; en este caso  $b-a$  es el  $\text{CO}_2$  fermentativo en aerobiosis y si  $c/b-a$  es mayor que 1 supondría un  $\text{CO}_2$  fermentativo extra que no aparece en presencia del oxígeno; en la práctica se concede margen a otros factores posibles y se considera que en una planta opera el efecto Pasteur cuando  $c-b$  es mayor que 1.

En cuanto a la respiración en las distintas etapas de la vida de la planta, en general, abundan las publicaciones, aunque no tanto en el caso de frutos. En conjunto se tiende a admitir una evolución del mecanismo oxidásico durante el desarrollo, juzgando fundamentalmente por la variación de la sensibilidad al cianuro. Se ha seguido la respiración a lo largo del desarrollo de guisantes (3), cebada (4) y en varias otras plantas (5) y los resultados parecen demostrar que desde el principio hay presente una actividad glicolítica y que sobre ella se va imponiendo poco a poco una actividad oxidativa.

En frutos se ha seguido la respiración de manzanas (6), peras (7), uva (8) y tomate (9) entre otros. En ellos la actividad respiratoria total del fruto crece hasta la maduración, mientras que referida a la unidad de peso se hallan cuatro períodos: a) alta actividad respiratoria, propia del fruto joven; b) un período de menor actividad mientras crece el fruto; c) un crecimiento llamado climatérico, que marca el comienzo de la maduración; d) disminución durante la vejez.

Existen, en cambio, muchos trabajos sobre la influencia de auxinas y factores del crecimiento sobre la respiración. En la exposición de la parte experimental citaremos también la influencia del corte del tejido y de la temperatura sobre la respiración y el cociente respiratorio respectivamente.

Sobre enzimas respiratorias en plantas encontramos abundancia de trabajos; sobre los frutos, en particular, el número es bastante inferior, pero concretamente catalasa, peroxidasa y ascórbico oxidasa sí han sido bastante estudiados. Se ha detectado actividad catalasa en muchos frutos y GUSTAFSON (10) llega a la conclusión de que a una alta velocidad de respiración o de crecimiento corresponde siempre una alta actividad catalasa, mientras que TOMBESSI encuentra en el tomate una fuerte disminución de la actividad a lo largo del crecimiento y un aumento al principio de la maduración (11). Las actividades peroxidasa y ascórbico oxidasa parecen ser muy abundantes en frutos.

El posible papel fisiológico de estos enzimas también ha sido objeto de muchas publicaciones, pero es muy poco lo que se conoce realmente hasta ahora.

Catalasa y peroxidasa ofrecen, en principio, la propiedad común de usar como sustrato el peróxido de hidrógeno, pero mientras que la catalasa utiliza para descomponer el complejo de transición otra molécula de  $H_2O_2$  produciendo oxígeno, la peroxidasa es capaz, a partir del complejo, de producir la oxidación de una gran variedad de sustancias: esto es cierto también para catalasa, en cuanto es capaz de actuar como peroxidasa, lo cual hace cuando la concentración de  $H_2O_2$  no es grande. MAPSON (12) recopiló una serie de sustancias que pueden actuar como donantes de electrones para la acción catalásica o peroxidásica.

En principio la capacidad para descomponer el  $H_2O_2$  no es un factor despreciable desde el punto de vista fisiológico, pues supone la desintoxicación del tejido, que de otra forma no podría soportar una gran variedad de oxidaciones que producen peróxido de hidrógeno, pero existe la convicción y bastante evidencia de que esta destrucción va seguida, en muchos casos, de la oxidación de otros productos, algunos de los cuales, como el ácido ascórbico y los polifenoles, por ser intermedios en los procesos redox, aceptarán después electrones de otros sustratos, con lo que la acción oxidativa procedente de la peroxidasa puede alcanzar ya a infinidad de sustancias. Además de estas oxidaciones indirectas también actúa directamente la peroxidasa sobre los aminoácidos tirosina, triptofano y cisteína, a través de lo cual se hace evidente su acción sobre enzimas y proteínas. Se sabe, por ejemplo, que la peroxidasa inactiva las toxinas del tétanos y la difteria, la hipertensina, algunos anticuerpos, la betaamilasa, la invertasa, etc. (13).

Otro aspecto interesante de la peroxidasa es su capacidad para actuar como oxidasa para el ácido dihidroxifumárico y esta reacción, acoplada con la presencia de compuestos aromáticos, da origen a la creación de grupos  $-OH$  en las posiciones electronegativas del núcleo. La hidroxilación no es específica en cuanto al sustrato y, por tanto, son muchas las sustancias aromáticas que pueden sufrirla.

Las funciones del ascórbico oxidasa en la respiración de los tejidos se encuentra actualmente en el período de las hipótesis y el problema más corriente es la comparación con citocromo oxidasa en cuanto al papel representado cuando están presentes ambas. Este problema se acentuó desde que por vez primera DAVISON (14) y HACKNEY (15) concluyeron, aunque de forma poco correcta, que la ascórbico oxidasa podría actuar como oxidasa terminal en plantas jóvenes de guisantes. Desde entonces son muchos los investigadores que sustentan dicha opinión, pero en muchos casos se ha acabado por reconocer que no es ella, sino la citocromo oxidasa la que cumple dicha misión. Tampoco MAPSON (16) acepta como



definitiva la conclusión de BONNEER (17) de que la ascórbico oxidasa no puede actuar como oxidasa terminal.

Todo esto puede dar una idea de la falta de seguridad sobre el verdadero papel de dicho enzima, pero lo que resulta indudable es su capacidad para oxidar el ácido ascórbico y ello puede ser de gran valor, puesto que el sistema ascórbico-dehidroascórbico se va reconociendo, cada vez más, como regulador del potencial redox en la célula, junto con glutatión, cisteína y piridina nucleótidos.

Sobre el limón la mayoría de los trabajos proceden de las bibliografías rusa, italiana y americana.

BIALE (18) estudia la respiración de limones verdes a varias concentraciones de oxígeno en la atmósfera y concluye que en el aire la velocidad de desprendimiento de  $\text{CO}_2$  disminuye gradualmente con el tiempo; para concentraciones de  $\text{O}_2$  superiores a la atmosférica observa un climatérico. Al disminuir la concentración de oxígeno observa una disminución de la respiración hasta llegar a una concentración que él llama crítica y que varía de un fruto a otro entre 0,5 y 5 % de oxígeno, por debajo de la cual la respiración aumenta otra vez. Los cocientes respiratorios observados son casi siempre menores que la unidad, mientras que el  $\text{CO}_2$  anaerobio/ $\text{CO}_2$  aerobio es mayor que la unidad, lo que indica la presencia del efecto Pasteur. En cuanto a la vida de almacenaje considera una concentración óptima de oxígeno del 5 %. El mismo BIALE estudia posteriormente (19) el almacenaje en atmósfera con cantidades variables de oxígeno (0 a 100 %) dióxido de carbono (0 a 10 %) y etileno (0 a 10 p.p.m.) observando ahora que la concentración óptima de oxígeno es de 5 a 10 % y que el oxígeno no está relacionado con la acción del etileno, pero que el dióxido de carbono actúa en el sentido de contrarrestar su acción. Un análisis de los gases producidos por el fruto conduce a BIALE (20) a la conclusión de que el limón no produce climatérico y tampoco etileno.

Mientras que las investigaciones americanas procedentes, principalmente de BIALE y colaboradores, se preocupan de la composición de la atmósfera idónea para el almacenaje, las investigaciones rusas profundizan más en el problema de la respiración, investigando, sobre todo, el problema de la aerobiosis y anaerobiosis y la fracción de la respiración sensible al cianuro. RAKITIN (21) analiza en el fruto sustancias tales como el ácido acético y el etanol, productos típicos de la respiración anaerobia, y observa la mayor acumulación de dichas sustancias durante la maduración. ARTSIKHOVSKAYA y colaboradores afrontaron el mismo problema desde diversos puntos de vista y sus publicaciones son, quizás, las más logradas en este sentido. Empiezan (22) por los gases oxígeno y dióxido de

carbono en el interior del fruto, observando una gran proporción de  $\text{CO}_2$ , lo que caracteriza los procesos anaerobios; la relación  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  de los gases analizados crece al madurar el fruto desde 0,53 hasta 1,35 y la baja relación en los frutos verdes la relacionan con el alto nivel del ácido cítrico, producto típico del metabolismo anaerobio, llegando a la conclusión de que la resistencia a los procesos anaerobios crece hasta la etapa de amarillo pálido. Atribuyen las diferencias de la composición de los gases a la poca permeabilidad de la piel, de lo que dan por supuesto que en el interior del fruto funcionarán sistemas enzimáticos oxidativos capacitados para actuar en presencia de poca concentración de oxígeno.

No hemos vuelto a encontrar en la bibliografía trabajos que usen este método de análisis de los gases y los mismos autores en publicaciones posteriores orientan el problema hacia el uso del cianuro como inhibidor de la respiración. Un trabajo publicado en 1949 (23) estudia los tipos de oxidasas sensibles, o no al cianuro y llega a la conclusión de que la actividad suprimida por éste es máxima en la maduración y comprende el 72-74 % de la respiración total, después de lo cual decae claramente esta fase de la actividad, mientras que crece la no afectada por el cianuro. La mayor actividad, en general, la encuentran en la etapa de verde amarillento.

Mientras que en esta publicación observan gran disminución de la respiración sensible al cianuro al alcanzar la etapa de amarillo, en una publicación posterior (24) encuentran que en el período de madurez total (noviembre-diciembre) crece la sensibilidad al cianuro, lo que da una idea de los diferentes resultados que se obtienen en los mismos ensayos realizados en épocas distintas.

HARVEY (25) aborda también este problema, pero con frutos almacenados, en los que estudia el potencial anaerobio y observa que cambia continuamente: aumenta durante las primeras semanas del almacenaje y después disminuye hasta el final de la vida del fruto.

Otro aspecto estudiado por el grupo ruso es el efecto que el corte del tejido produce en la respiración, tema del que haremos mención en la parte experimental. En una primera comunicación (26) observan que en el flavedo aumenta hasta tres veces la respiración total y en el albedo hasta seis, mientras que en un trabajo posterior (27) observan con el tiempo una variación de dicha influencia, desde septiembre (frutos jóvenes) en que sólo hay un ligero aumento, hasta el tiempo de la total madurez, en que la respuesta crece claramente. Llegan a la conclusión de que, al menos las variedades de limón más estables al almacenaje poseen un alto nivel de actividad oxidativa dinámica muy sensible a cualquier estímulo fisiológico.

Algún otro trabajo aislado sobre la respiración del limón aparece en la bibliografía, pero carecen de interés. HALLER, ROSE, LUTZ, y HARDING (28) observan que después de cogidos los frutos la velocidad de respiración aumenta con la temperatura y, a alta temperatura (21-43° C), disminuye con el tiempo; la actividad respiratoria resulta proporcional a los pesos frescos; la adición de etileno acelera la respiración.

LEÓN G. GONZÁLEZ (29) congela primeramente los frutos a -7° C y después les mide la capacidad respiratoria a 0 y 20°, observando que la congelación previa da lugar a un estímulo de la respiración, estímulo que es tanto mayor cuanto más tiempo han estado congelados.

En cuanto a las actividades enzimáticas, motivo de nuestro trabajo, la bibliografía es sumamente reducida. Sólo se observa alguna variedad de publicaciones en cuanto a la capacidad del fruto para oxidar el ácido ascórbico. ARMENTANO y BARTOK (30) después de estudiar una serie de frutos, entre los que incluyen el limón, llegan a la conclusión de que aquellos que contienen poca vitamina C son ricos en la actividad ascórbico oxidasa y viceversa; en limón no observan actividad.

Se ha recurrido (31) a pasar aire a través de jugo de limón a 20 y 100° observándose en el segundo caso mayor estabilidad del ácido ascórbico que en el primero, de lo que se deduce actividad ascórbico oxidasa. Repetido el ensayo pasando aire a 20° por jugo hervido y sin hervir, el hervido pierde más lentamente su capacidad reductora, lo que confirma la actividad. Los autores de este trabajo sostienen que el material celular del limón protege contra la oxidación del ácido ascórbico por el aire. lo que deducen por que al filtrar el jugo se disminuye su estabilidad. Una conclusión parecida consigue SOMOGY (32), quien dice que el jugo de limón contiene algo que protege al ácido ascórbico contra la acción de la ascórbico oxidasa; la sustancia se separa parcialmente por filtración y se inactiva por el calor. No debe ser inhibidor específico del cobre por que no influye sobre la polifenoloxidasa de manzanas. Un trabajo italiano posterior (33) cita unos ensayos de almacenaje de dos disoluciones de ácido ascórbico. La primera es un jugo de limón fresco tamponado a pH 6,15, mientras que la segunda es una solución del ácido sintético. La primera pierde durante el almacenaje el 2,6 % de la vitamina, mientras que la segunda pierde el 5,3 %. La adición de ascórbico oxidasa eleva estos datos, en las mismas condiciones, a 56 y 69 % respectivamente.

Sobre actividad catalasa en limón no hemos encontrado referencias bibliográficas, aunque sí se ha estudiado en hojas. Un trabajo ruso (34) observa que es mayor en hojas maduras y mínimo en hojas cloróticas. Hace la interesante sugerencia de que esta actividad sea un importante factor en el ritmo endógeno, o, al menos, sea una medida precisa de él y

apunta la posibilidad de que al influir en la actividad catalasa sea posible preparar ventajosamente el árbol para una buena invernada.

Sobre actividad peroxidasa en el fruto existe un trabajo italiano (35) que deduce una relación entre dicha actividad y la intensidad de los procesos biológicos. Disminuye en el sentido flavedo, albedo, membrana, jugo, siendo completamente nula en éste, lo que considera debido a su gran acidez ( $\text{pH} = 3$ ).

## ESTUDIO ENZIMATICO

Al tratar de determinar actividades enzimáticas es decisivo para elegir un método, el estado del material a estudiar y los fines que se persiguen al determinar dichas actividades.

Nuestros fines son solamente comparativos, lo que indica que los valores que demos para las actividades no tienen un valor absoluto.

El material a estudiar es variable, pues se trata de zonas del fruto con propiedades distintas unas de otras; incluso en la zona de los sacos difiere mucho la naturaleza desde el fruto joven hasta la plena madurez; el problema fundamental radica aquí en la acidez del material en estudio. Nosotros extraemos los enzimas de flavedo, albedo y sacos muy jóvenes (sin ácido) con tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 con el fin de ayudar a solubilizar el enzima y, sobre todo, para neutralizar la acidez natural del material a estudiar, puesto que estos enzimas presentan poca estabilidad en medio ácido. Con sacos cargados con ácido cítrico no puede extraerse con dicho tampón por que requeriría cantidades muy grandes, lo cual diluiría demasiado el enzima, precisamente en una zona en que las actividades suelen ser muy bajas, por lo que nos vemos obligados a usar fosfato bisódico 0,2 M en cantidades variables, de tal forma que el homogenado tenga un pH final comprendido entre 5,5 y 6,0.

Queremos advertir aquí que el término «ascórbico oxidasa» lo usamos independientemente de la naturaleza del enzima.

## ACTIVIDAD CATALASA

Los métodos más usuales para la determinación de actividad catalasa son el manométrico y el volumétrico. De ellos el primero, tratándose de homogenados, tiene el riesgo de intercambios de gas que, aunque pequeños, son ajenos a la actividad en estudio y con frecuencia constituyen causa de error. Los métodos volumétricos son prácticos y más exactos y consisten en una permanganimetría del peróxido de hidrógeno no consumido (VON EULER y JOSEPHSON) o una iodometría, que valora con tiosulfato el iodo puesto en libertad al reducir con exceso de ioduro potásico el peróxido de hidrógeno no consumido. De ambas volumetrías la permanganimetría presenta, con homogenados, el inconveniente de unos consumos para el ensayo en blanco que, a veces, resultan bastante elevados, por lo que nos decidimos por la iodometría.

El método de SUMNER y DOUNCE, modificación del de JELLES, consiste en lo siguiente:

A 50 ml de una solución 0,01 N de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato M/150 de pH 6,8, enfriada a 0° C se añade 1 ml de la solución de enzimas apropiadamente diluida. Al cabo de los 0, 3, 6, 9 y 12 minutos se van tomando cada vez 5 ml de la solución y se vierten sobre sendos vasos que contienen 5 ml de ácido sulfúrico al 10 %. Se añade a cada muestra 1 ml de IK al 5 % y 0,5 ml de solución saturada de ácido molíbdico. Se mezcla bien y se deja reposar durante unos tres minutos, al cabo de los cuales se añaden unas gotas de solución de almidón y se valora con tiosulfato 0,005 N. Los valores obtenidos se llevan a la fórmula

$$k = \frac{1}{t} \lg \frac{A}{A-x}$$

donde A = ml de tiosulfato gastados en el tiempo y 0 y A-x = ml gastados al cabo de los t minutos.

Los valores de k se llevan a una gráfica frente al tiempo y, por extrapolación se calcula k, constante de velocidad de primer orden.

La determinación de la constante de velocidad requiere un material más purificado que el usado por nosotros y, sobre todo, un rango determinado de concentración de enzima entre límites muy estrechos, lo que para nosotros supondría una serie de ensayos previos que entorpecería mucho el trabajo y la ventaja no sería muy grande, dado el carácter comparativo de nuestros ensayos. Por ello seguimos el método exactamente igual, pero sin intentar calcular la constante de velocidad. Los resultados podemos expresarlos por la diferencia o el cociente entre los mililitros de tiosulfato iniciales y los consumidos al cabo de un tiempo determinado, que tomamos de 9 minutos, habiéndonos decidido por la diferencia por prestarse más fácilmente a comparaciones, pero teniendo en cuenta que no existe linealidad entre los valores y las actividades.

Aparte de esta modificación respetamos los demás detalles del método porque al trabajar a 0° y con tan baja concentración de enzima eludimos, en lo posible, la toxicidad del sustrato con respecto del enzima.

En las primeras pruebas intentamos observar la variación de la actividad catalasa con la fecha o el grado de madurez del fruto. Tal empeño resultó imposible, pues bien pronto nos convencimos de que en la actividad debían influir factores que no estábamos controlando; así, al ensayar con flavedo de frutos verdes sin el menor síntoma de clorosis o alguna otra enfermedad, procedentes del mismo árbol, cogidos en días diferentes, pero a la misma hora y en intervalos de tiempo relativamente pequeños obteníamos valores como los que expresamos a continuación en un cuadro donde cada actividad tienen una ordenada que hace referencia a la fecha y una abscisa relativa al peso del fruto:

15-2				0,30...		
6-2			1,55			
30-1		1,75				0,90
17-1	1,25				0,45	
	15	16	60	83	108	115

Se ve que, aun admitiendo que la actividad sea una función discontinua del grado de desarrollo o madurez, hay frutos demasiado próximos.

en este sentido (15 y 16 g, 108 y 115 g) que tienen actividades dentro de la norma de una mayor actividad en los frutos de menor peso.

Esta arbitrariedad de valores hace prohibitivo un intento serio de relacionar la actividad con el grado de desarrollo cuando se trata de muestras tomadas en días distintos, a no ser que se controlen muchos más factores, lo cual ampliaría demasiado nuestro trabajo; en cambio hemos dirigido nuestra investigación en el sentido de observar muestras cogidas en un mismo día, lo cual ha dado resultados más regulares, aunque de esta forma sólo tienen valor comparativo los ensayos realizados en un mismo día. De acuerdo con esto hemos comparado frutos en diversos grados de desarrollo y madurez, así como las distintas zonas del fruto. Como criterio del grado de desarrollo hemos tomado el peso de los frutos verdes, mientras que para juzgar el grado de madurez hemos tomado como guía el color del flavedo.

Empezamos con dos ensayos generales, en cada uno de los cuales analizamos flavedo, albedo y sacos; el primer ensayo se hizo con cinco frutos verdes, aparentemente sanos y con pesos variables de 11,7, 22, 26,5, 47 y 68 gramos. El segundo se realiza con cinco frutos plenamente desarrollados, de los cuales el primero está completamente verde (A), el segundo verde amarillento (B), el tercero es amarillo pálido y se puede considerar como un fruto de madurez normal (C), el cuarto posee un color amarillo intenso, propio de una madurez avanzada o, quizás excesiva (D) y el quinto es un fruto casi blanco de un árbol con intensa clorosis (E). Los resultados obtenidos son los siguientes:

#### *Ensayo con frutos verdes*

<i>peso del fruto</i>	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
11,7 g	1,20	0	0
22	1,60	0	0
26,5	2,80	0,15	0,15
47	1,90	0,10	0,35
68	1,75	0	0

#### *Ensayo con frutos desarrollados*

<i>notación</i>	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
A	1,50	0	0
B	1,55	0	0
C	1,45	0,25	0
D	1,20	0,50	0,20
E	0,45	0	0



Antes de discutir estos datos debemos hacer constar que, por una parte los ensayos se hicieron en invierno (17 y 19 de febrero respectivamente) y por término medio la actividad es menor en invierno que en verano y, por otra parte, en esta época el árbol se hallaba excesivamente cargado de frutos de todos los tamaños, lo cual puede influir en las actividades con respecto a lo que ocurriría si el árbol tuviera menos frutos y más homogéneos. Vamos a exponer un ensayo paralelo con frutos verdes realizado en verano del mismo año:

<i>peso del fruto</i>	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
13 g	3,05	0	0
17,5	3,35	0,40	0
45	6,45	0,45	0
62	3,15	0,45	0

Del conjunto de ambos ensayos con frutos verdes se deduce una actividad extraordinariamente mayor en el flavado que en las demás zonas y, dentro del flavado, una franca superioridad del fruto de verano sobre el de invierno. En ambos casos el fruto de menor peso presenta una menor actividad; ésta va aumentando al aumentar el peso, pasa por un máximo y después decrece. Dicho máximo aparece en el primer ensayo en el fruto de 26,5 gramos y en el segundo en el de 45 gramos con un valor elevadísimo. En el albedo y los sacos los valores son demasiado pequeños para hacer comparaciones, pero aun así resalta el que en el ensayo de invierno la actividad de los sacos sea siempre ligeramente mayor que la de los albedos y, en cambio en verano no se haya conseguido nunca ver actividad en sacos.

El ensayo de verano con frutos adultos, paralelo al de invierno, es imposible de realizar porque en dicha época las frutos adultos están todos maduros y no se puede seleccionar una escala de grados de madurez. Lo hacemos en noviembre del mismo año con la variante, con respecto al ensayo anterior, de que ahora el árbol está desprovisto de frutos verdes; las características de las muestras son: verde débil (A), amarillo ligeramente verdoso (B), amarillo intenso (C) y casi blanco de árbol clorótico (D), resultando:

<i>notación</i>	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
A	1,90	0,25	0
B	1,85	0	0
C	1,75	1,15	0
D	0,65	0	0

En conjunto se cumple también en frutos adultos la extraordinaria superioridad del flavedo sobre las demás zonas; no hay considerables variaciones de actividad durante la maduración y, sólo en el fruto amarillo intenso se observa en ambos casos un ligero descenso aparte, claro está, del caso de frutos cloróticos, en los que la actividad, lógicamente, resulta muy baja

Hemos considerado hasta ahora ensayos realizados simultáneamente con varios frutos. Este tipo de ensayo encierra dificultades de trabajo, por lo que a la vista de estos resultados tomamos como objetivo inmediato tratar de confirmarlos por separado en ensayos con un solo fruto.

En relación con las actividades en las distintas regiones del fruto se ha observado la superioridad del flavedo. Esto está de acuerdo con los trabajos que, con bastante fundamento, intentan relacionar las actividades catalasa y peroxidasa con pigmentos del tipo de la clorofila, pero nosotros hemos observado excepciones, todas en el caso de frutos muy jóvenes, excepciones que proceden siempre de los sacos:

	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
fruto de 14,3 g	0,30	0	0,25

Este caso es excepcional sólo hasta cierto punto, pues, aunque la actividad del flavedo es del mismo orden que la de los sacos, lo anormal aquí es el flavedo, que resulta muy poco activo. Casos así se dan pocas veces, pero nunca hemos podido relacionarlos con alguna alteración manifiesta. En cambio tiene un aspecto completamente distinto el caso siguiente:

	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
fruto de 12,5 g	0,90	0,30	1,00

en el que la actividad del flavedo es baja, pero no demasiado y, en cambio, los sacos alcanzan un valor excepcionalmente alto, superior incluso al del flavedo. El siguiente caso corresponde a un fruto de peso aún menor:

	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
fruto de 8,5 g	1,15	0,35	1,35

El que estas excepciones se dan siempre en frutos de tamaño tan reducido hace pensar que en la primera etapa del desarrollo existe una considerable actividad catalasa en la zona de los sacos. Sería, pues, lógico, investigar en frutos de tamaño aún inferior, pero en éstos la zona de los sacos no está muy definida.

Conviene observar que, dentro de un mismo rango de peso, inferior a 12,5 gramos, no siempre aparece la exaltada actividad de los sacos y, si ésta es un reflejo de la primera etapa del desarrollo se habrá de admitir que el peso no es un guía correcto de dicha etapa. Incluso en frutos menores encontramos ya el descenso correspondiente a los sacos:

	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
fruto de 9,3 g	2,15	0,25	0,45

pero contrariamente a lo que ocurre a la mayoría de los frutos de dicho peso, en éste la zona de los sacos está ya bastante bien definida.

Ya hemos hecho referencia a las dificultades que encierran los ensayos con varios frutos en un mismo día por el mucho tiempo que requieren. El resto de las pruebas realizadas lo han sido siempre con un solo fruto, comparando en él las distintas zonas. En algunos casos hemos trabajado también con la membrana que rodea a los sacos, pero ésta no ofrece marcadas diferencias con el albedo:

<i>frutos verdes de peso</i>	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>	<i>membrana</i>
30 g	3,00	0,30	0,65	
34,5	0,40	0	0	
108	1,15	0,30	0	0

		<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>membrana</i>	<i>sacos</i>
verde pálido	57 g	2,00	0,30	1,45	0
amarillo verde	100 g	1,60	0,15	0,20	0
frutos amarillos					
1.º		1,50	0		0
2.º		1,50	0,30		0
3.º		2,35	0		0
4.º		0,70	0,55		0

En general responden a lo que hemos visto hasta ahora, pero pueden observarse excepciones. Así, encontramos un fruto de 34,5 g que carece de actividad en albedo, lo que resulta muy poco frecuente en frutos verdes; precisamente es digno de notar que la actividad catalasa en albedo, a pesar de ser pequeña, mantiene en casi todos los casos de frutos verdes un nivel poco variable. Pero lo más extraño es la baja actividad en el flavado de dicho fruto de 34,5 g; debemos considerar estos casos de tan baja actividad en frutos de apariencia completamente normal como excepciones cuya causa nos resulta imposible localizar, por ahora. Del

fruto citado sólo podemos destacar que se cogió en un día muy frío, sin que sea esto una razón suficiente porque el fruto amarillo verdoso de 100 g se estudió dos días después, en un día frío también y, en cambio su actividad, que lógicamente debería ser menor por estar el fruto prácticamente maduro, resulta completamente normal.

## ACTIVIDAD PEROXIDASA

Se pueden encontrar en la bibliografía multitud de métodos para determinar actividad peroxidasa, tanto en homogenados crudos como en preparados purificados, sobre todo en los primeros, y no es tarea fácil la elección de uno adecuado, pues todos ellos presentan ventajas e inconvenientes. El método clásico de formación de purpurogalina a partir de pirrogalol y determinación colorimétrica de aquella tiende a desaparecer debido a una falta de relación exacta entre la cantidad de colorante formado y la actividad del tejido. Para homogenados crudos resulta muy apropiado el método de oxidación del ácido ascórbico no oxidado cuando actúa el enzima en presencia de éste, pero nosotros hemos preferido no emplearlo en vista de la gran capacidad del tejido que nos ocupa para oxidar el ácido ascórbico aún en presencia sólo del ácido, sin peróxido de hidrógeno.

El método que usa guayacol y mide colorimétricamente el producto de oxidación (el tetraguayacol) ofrece la ventaja de una buena relación entre el colorante formado y la actividad enzimática. Es el método más adecuado para medidas de cinéticas de reacción; pero dichas medidas en homogenados crudos es difícil que respondan a la realidad, debido a posibles interferencias y en un trabajo comparativo, como el que nos ocupa, podemos y debemos prescindir de ellas. Puede usarse el método para homogenados poniendo siempre la misma cantidad de peróxido de hidrógeno y teniendo en cuenta que el colorante formado no es estable con el tiempo, lo que pone limitaciones a la duración del ensayo. Las condiciones usadas por nosotros son, en principio, una modificación del ensayo

del guayacol expuesta por A. C. MAEHLY (*Methods of Biochemical Analysis*, vol. I, pág 386) y que dice así:

«A un ml de solución acuosa 20 mM de guayacol y 2,0 ml de tampón fosfato 10 mM de pH 7 añadir una cantidad apropiada de disolución de enzima. Leer la densidad óptica de esta mezcla a 470  $m\mu$  y poner el espectrofotómetro 0,05 unidades de densidad óptica por encima de la lectura. Añadir 20  $\mu$ l de  $H_2O_2$  10 mM al extremo de una pequeña varilla de agitación, sumergirla en la solución con movimiento y simultáneamente empezar a contar el tiempo. Medir el tiempo requerido para alcanzar el valor establecido de densidad óptica. La cantidad de enzima se ajusta de tal forma que el tiempo requerido varíe entre 6 y 100 segundos (el óptimo es de 10 a 30 segundos). El valor final de densidad óptica alcanzado después de unos pocos minutos debe ser de alrededor de 0,4 unidades y esto decide la cantidad de  $H_2O_2$  a añadir».

Respecto de este método hemos introducido algunas variantes propias de nuestro trabajo. En primer lugar, nosotros trabajamos con un colorímetro cuyos tubos requieren por lo menos 10 ml de volumen total, por lo que las cantidades usadas son proporcionalmente superiores. Además de esto hemos preferido tomar como actividad, no el tiempo necesario para llevar la densidad óptica a un valor determinado, sino el incremento de densidad óptica en un tiempo determinado, que es de un minuto, tiempo que cae dentro de lo permitido. Como hemos de trabajar con actividades bastante variables en magnitud no podemos sujetarnos a unas normas fijadas para estudios con enzimas purificados y, por otra parte, nosotros sólo aspiramos a obtener datos comparativos: así, con nuestra modificación intentamos evitar el peligro de que el tiempo necesario para alcanzar un aumento de 0,05 unidades de densidad óptica sea demasiado largo (muy pequeña actividad), con lo que nos veríamos en el riesgo de tener que preparar un homogenado más concentrado que, cuando se analizan varias muestras complicaría mucho el trabajo y, por otra parte, el aumentar la concentración del material en estudio implica el riesgo, con homogenados de flavedo, de un valor inicial de transmisión demasiado pequeño y la consiguiente disminución de la sensibilidad de la operación. Con este método hemos medido pequeñas actividades y, en los casos de actividades elevadas se observa, al principio, un descenso demasiado brusco en la transmisión, seguido de un ligero estacionamiento y, a continuación, una lenta elevación; por ello preferimos usar siempre la misma cantidad de  $H_2O_2$  (50  $\mu$ l) y, en todo caso diluir, mejor que concentrar el preparado activo. Para poder observar la evolución tenemos que hacer lecturas en el colorímetro a los 0, 30, 60 y 90 segundos de la adición del  $H_2O_2$ , lo cual no es grave inconveniente y, en cambio, nos in-

dica cuándo debemos repetir el ensayo reduciendo la concentración del preparado. Si la actividad es muy pequeña la diferencia de lecturas en los tiempos 0 y 60 segundos puede llegar a interferir con el error experimental permitido, debido al aparato. Este es de una unidad de tanto por ciento de transmisión y, por lo tanto, no podemos tomar en cuenta la actividad que corresponda a menos de dos unidades de tanto por ciento de transmisión, lo que en la zona de transmisiones que solemos usar (de 80 a 100 %) supone aproximadamente 0,01 unidades de densidad óptica. Aunque el método es muy sensible hemos tenido que dar como carentes de actividad algunos preparados; sobre todo de sacos de frutos adultos, que, en realidad dan la impresión de tenerla, aunque pequeñísima, por la insistencia en repetirse los valores.

Los primeros ensayos fueron encaminados a determinar la cantidad de tejido adecuada para las determinaciones. Empezamos por triturar un gramo de material con 10 ml de tampón y después de centrifugar, tomamos 1 ml para el ensayo. Ensayamos con la zona del albedo de un fruto de 92 g y con flavedo y sacos de un fruto de 15 g. Exponemos los resultados expresando los porcentajes de transmisión leídos cada 30 segundos:

albedo de fruto de 92 g.

segundos	0	30	60	90	120
% transmisión	47	38	35	35	36

flavedo y sacos de fruto de 15 g.

segundos	0	30	60	90	120
flavedo	69	53	53	54	55
sacos	90	86	82	80	81

Se observa que, prescindiendo del caso de sacos, la actividad resulta extraordinariamente grande para nuestro método. Hacemos otro ensayo con un fruto de 100 g usando sólo 0,5 ml del preparado y completamos con tampón hasta 1 ml, obteniendo:

segundos	0	30	60	90	120
flavedo	89	68	67	68	70
albedo	97	87	84	82	81
sacos	97	93	90	88	87

Del mismo homogenado del flavedo tomamos 0,1 ml y el resultado ya queda dentro de lo aceptable:

97            91            85            81            78

Pero en el mismo ensayo anterior con 0,5 ml la prueba con sacos resulta aceptable o, casi aceptable; estas grandes variaciones nos han inducido a usar siempre 1 g de tejido triturado con 10 ml de tampón y, a partir de esta solución, en el caso de grandes actividades hacer las diluciones correspondientes, que para flavedos han llegado a ser hasta de 1 a 25. De esta forma los resultados los expresamos como incremento de densidad óptica por 1 ml de homogenado en un minuto, haciendo la conversión necesaria cuando se precisa una dilución.





## ACTIVIDAD POR ZONAS Y ETAPAS

Como en el caso de catalasa, tampoco existe una íntima relación entre grado de desarrollo y actividad cuando se juzgan frutos cogidos en días diferentes. En prueba de ello exponemos algunos de los resultados obtenidos:

día 7 de enero de 1959. Fruto de 35 gramos.

<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
0,737	0,125	0,031

día 10 de enero de 1959. Fruto de 68 gramos:

<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
0,322	0,088	0,025

día 23 de febrero de 1959. Fruto de 26 gramos:

<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
0,308	0,072	0,112

por lo que sólo podemos comparar frutos cogidos el mismo día y, aún así, se observarán a veces valores difíciles de predecir. En cambio, la actividad relativa de cada una de las zonas del fruto en los distintos grados de madurez sí responden, salvo rara excepción, a unas líneas generales.

En cuanto a la etapa de la vida del fruto hemos recurrido, como en el

caso de catalasa, a muestras cogidas en el mismo día. En ensayo de frutos desarrollados empezamos con una serie paralela a la catalasa, o sea, fruto verde desarrollado (A), amarillo verdoso (B), amarillo normal (C), amarillo intenso (D) y amarillo muy pálido de árbol clorótico y resulta:

	A	B	C	D	E
flavado	0,351	0,380	0,360	0,317	0,0
albedo	0,029	0,028	0,010	0,010	0,0
sacos	0,014	0,0	0,0	0,023	0,0

como se ve, la zona de mayor actividad corresponde al flavado, con mucha diferencia con respecto a las demás. Dentro de los valores del flavado, en primer lugar, no hay diferencias dignas de tener en cuenta durante el proceso de la maduración; ni aún del verde al amarillo se acusa diferencia notable. Los valores nulos del fruto clorótico caen perfectamente dentro de lo previsible.

Los datos correspondientes a actividad en albedos y en sacos, sobre todo en estos últimos, resultan muy pequeños y entre ellos es difícil establecer alguna comparación significativa, debido a la proximidad del error experimental, aunque sí puede deducirse una manifiesta inferioridad de los sacos.

El problema de los sacos ha atraído nuestra atención porque supone una zona de muy poca vitalidad y porque el trabajo que hemos encontrado en la bibliografía sobre este tema (35) afirma que dicha zona del fruto carece en absoluto de actividad. Es cierto que las actividades encontradas por nosotros son muy bajas, pero resultan indudables porque suponen a veces diferencias de lecturas en el colorímetro de hasta 5 unidades de tanto por ciento de transmisión y porque, aún a simple vista, se observa en el líquido del tubo colorimétrico la tonalidad propia del producto de oxidación del guayacol. Para afirmarnos hemos realizado un ensayo dirigido exclusivamente en este sentido usando sacos de tres frutos adultos con las siguientes características: verde amarillento (A), amarillo reciente (B) y amarillo intenso (C) y resulta:

	A	B	C
	0,019	0,010	0,023

que en la práctica corresponden a las siguientes lecturas en el colorímetro:

segundos	0	30	60	90	120
A	98-99	96-97	94	92-93	91
B	98	97	96	95	94
C	96	94	92-93	91-92	90-91

Estas determinaciones pueden hacerse gracias a la carencia de color en dicha zona del fruto, lo que hace que el valor inicial de transmisión sea muy alto y una pequeña variación de la densidad óptica lleve consigo una diferencia de transmisión apreciable.

Los sacos constan de la envoltura fina y del jugo interior. Tratando de localizar la actividad preparamos con los sacos del limón C un homogenado de tal forma que realizamos una ligera presión con el fin exclusivo de extraer el jugo sin triturar los sacos, con lo cual las envolturas se separan al centrifugar. El sobrenadante de esta operación dió la misma actividad que en el ensayo anterior, lo cual induce a pensar que la actividad se halla localizada en el jugo, pues no resulta probable que sin una trituración el enzima que exista en la envoltura pase a la disolución en forma considerable.

En el fruto A del ensayo anterior encontramos una parte de los sacos deteriorada por el frío, fenómeno que, aunque no fué general en el invierno de 1959-60 (fecha de esta operación) sí se encuentra a veces en algún fruto aislado. Sentimos curiosidad por estudiar esta parte de los sacos y nos encontramos con una actividad sorprendente de 0,103, nunca hallada, ni mucho menos, en sacos de fruto adulto normal. La carencia de frutos deteriorados por baja temperatura nos impidió estudiar más a fondo este problema.

De todas formas son varios los frutos adultos en que no se observa actividad en sacos y ello no sabemos si es debido a que, efectivamente no exista en algunos sacos o a las limitaciones experimentales.

Respecto del valor de la actividad en flavedos el ensayo realizado puede ofrecer dudas de que sea verdaderamente significativo porque se realizó, como en el caso de catalasa, en época en que el árbol se encuentra muy cargado de frutos maduros y verdes. Por ello pensamos repetirlo en condiciones lo más parecidas posible, pero evitando dicho inconveniente, a partir de frutos cogidos en noviembre de 1959. Operamos con cuatro frutos, de los cuales uno posee el color verde, aunque está plenamente desarrollado (A), dos frutos amarillos normales con aspecto de madurez más reciente (B) y más avanzada y color intenso (C) y un fruto cogido de árbol clorótico (D). Resulta:

A	B	C	D
0,061	0,054	0,050	0,015

Los valores son los más bajos conseguidos en flavedos pero, aparte del fruto enfermo, los demás mantienen un valor bastante parecido, lo que confirma la poca variación de la actividad durante la maduración. Los

valores tan bajos de este ensayo confirman la imposibilidad de relacionar frutos cogidos en distintas fechas, pero no podemos asignar rotundamente ascensos y descensos en la actividad a las épocas del año porque entre los 15 días anteriores y los veinte posteriores al ensayo precedente contamos con los siguientes valores de actividad en flavedo:

1.º . . . . .	0,224
2.º . . . . .	0,082
3.º . . . . .	0,314
4.º . . . . .	0,137
5.º . . . . .	0,244
6.º . . . . .	0,338

y, en cambio, en dicho ensayo los tres valores (el fruto clorótico es un problema distinto) son bajos y del mismo orden.

En frutos jóvenes la actividad resulta ser bastante mayor. Exponemos dos ensayos de tipo general realizados, uno en invierno y el otro en verano de 1959.

#### Ensayo de invierno:

<i>peso del fruto</i>	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
12,5 g	0,644	0,098	0,023
21	0,417	0,075	0,023
36	0,555	0,084	0,035
58	0,202	0,040	0,030

#### Ensayo de verano:

<i>peso del fruto</i>			
13 g	1,435	0,164	0,019
17,5	0,887	0,117	0,017
45	0,955	0,166	0,026
62	0,707	0,117	0,021

No difieren los frutos jóvenes de los adultos en las actividades relativas de sus zonas, tanto de flavedo con respecto a las otras dos, como de albedo con respecto a sacos. Como en el caso de catalasa, puede afirmarse de forma general que en verano la actividad es notablemente más alta que en invierno, con excepción de los sacos. En cuanto a la etapa de desarrollo, a la vista de estos resultados y de los obtenidos en frutos maduros, puede asegurarse que la actividad va decreciendo conforme el fruto va desarrollándose y que al llegar al pleno desarrollo y empezar la

maduración se mantiene aproximadamente constante. Coincide con catalasa en la exaltada actividad del flavedo pero, en cambio, aquí es general el predominio del albedo sobre los sacos, lo que no ocurre en catalasa.

Entre nuestros datos poseemos dos excepciones a esta norma general:

	<i>un fruto de 13 g</i>	<i>un fruto de 10,5 g</i>
flavedo	0,673	0,613
albedo	0,183	0,175
sacos	0,382	0,422

Debe observarse que en ambos casos se trata de frutos muy pequeños. A propósito de esto recuérdese que en catalasa estos valores excepcionales de los sacos eran incluso superiores a los del flavedo, lo que se corresponde con la idea de una gran actividad de la zona de los sacos en la época de su desarrollo inicial.

El resto de los ensayos de peroxidasa realizados obedece generalmente a lo expuesto hasta ahora, pero, como se trata de ensayos hechos en cada caso con un solo fruto sólo tienen valor comparativo en cuanto a las zonas del fruto considerado. Puede observarse en ellos la diferencia de actividad que ofrecen frutos de peso parecido sin que exista relación exacta con la fecha.

Frutos verdes:

<i>peso en g</i>	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
25	0,320	0,057	0,012
40	0,590	0,112	0,027
17	0,806	0,294	0,052
38	0,713	0,150	0,015
93	0,444	0,090	0,016
71	0,582	0,135	0,035

Frutos adultos:

1.º	0,228	0,018	0,012
2.º	0	0,023	
3.º	0,323	0,023	0
4.º	0,441	0,052	0,052
5.º	0,382	0,035	0

Aparte de los frutos con clorosis, ya citados, se han encontrado otros dos con actividad nula en todas sus zonas.

En algunos casos se ha ensayado también la película que rodea los sacos:

<i>características</i>	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>película</i>	<i>sacos</i>
verde de 120 g	0,488	0,115	0,098	0
verde pálido 11 g	0,078	0	0	0
amarillo reciente	0,574	0,063	0,048	0,033

Como se ve, ocupa, en cuanto a actividad, una posición intermedia entre albedo y sacos.

A lo largo de estos ensayos aparecen algunos casos completamente anormales, destacando entre ellos el 2.º entre los maduros, con actividad nula en la zona del flavado y el de 112 gramos verde pálido, con actividad bajísima en el flavado y nula en las demás zonas. Debe advertirse que estos frutos, al menos en apariencia, no presentaban síntomas de enfermedad o deterioro alguno.



## CAPACIDAD PARA OXIDAR EL ACIDO ASCORBICO

En principio fué nuestra intención estudiar junto a enzimas como catalasa y peroxidasa, dependientes del hierro las actividades fenolasa y ascórbico oxidasa que dependen del cobre y observar, así, una dependencia posible entre la vida del fruto y dicho metal en alguna etapa del desarrollo o bien de la maduración del fruto. Pero hay que tener en cuenta que no sólo son capaces de oxidar el ácido ascórbico los enzimas dependientes del cobre. Los hallados en tejidos de plantas y que son capaces de cumplir dicha misión pueden dividirse en dos grupos: a) aquellos en que la oxidación del ácido es secundaria a la oxidación del substrato propio del enzima; b) aquellos en que hay reacción directa entre el enzima, el ácido ascórbico y el oxígeno.

En el primer grupo se incluyen polifenolasa, lacasa, citocromo oxidasa y peroxidasa; en el segundo grupo, hasta ahora, sólo se conoce un enzima, la ascórbico oxidasa. Puede observarse que se trata de enzimas que en su grupo prostético llevan hierro o cobre. Ninguno puede actuar en ausencia de oxígeno o en presencia de cianuro, pero, además, polifenolasa y ascórbico oxidasa (dependientes del cobre) tampoco actúan en presencia de los inhibidores específicos del cobre, tales como dietilditiocarbamato sódico. Puesto que, efectivamente, encontramos en los tejidos del fruto una capacidad variable para oxidar el ácido ascórbico, pensamos que lo más inmediato sería el estudio de la naturaleza de dicha oxidación, lo cual intentamos, especialmente, mediante el empleo de inhibidores.

Partiendo, en principio, de la suposición de una actividad fenolasa o ascórbico oxidasa adoptamos el método analítico, que es más usual para homogenados, y que valora al cabo de un determinado tiempo el ácido ascórbico no consumido durante la reacción. Para ello usamos los siguientes reactivos:

- a) tampón citrato fosfato 0,1 M de pH 5,7
- b) solución de ácido ascórbico purísimo (1 mg/ml)
- c) solución de ácido metafosfórico al 5 %
- d) solución de almidón al 1 %
- e) solución de iodo 0,01 N
- f) preparado en estudio, obtenido por extracción de 0,5 gramos del material con 5 ml de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,0.

Todos los reactivos se prepararon con agua dos veces destilada en aparato de vidrio Pyrex a fin de evitar en lo posible la presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$ .

Para la determinación de actividad se ponen en un vaso lavado con agua bidestilada 3 ml de a), 2 ml de b) y 1 ml. de f), más o menos diluída, en cuyo instante se empieza a controlar el tiempo y, durante un tiempo determinado, se agita a mano a fin de que la poca afinidad del enzima para el oxígeno, así como el mucho consumo del mismo, no nos limiten la velocidad de la reacción. Transcurrido dicho tiempo se ponen 5 ml de c), se agita para mezclar bien y, después de añadir almidón se valora con la solución de iodo. Este ensayo se repite, pero poniendo el ácido metafosfórico antes que el problema, con lo cual existe inhibición desde el principio y, por lo tanto, este segundo ensayo nos sirve de testigo. La diferencia entre el testigo y el problema nos da el iodo equivalente al ácido ascórbico consumido durante la reacción. La actividad puede expresarse en forma de miliequivalentes de iodo, milimoles de ácido ascórbico o volumen, en condiciones normales, de oxígeno consumido. Puesto que todas estas formas de expresión son fácilmente interconvertibles consideramos suficiente expresar los resultados como mililitros de  $\text{I}_2$  0,01 N equivalentes a la vitamina consumida durante la acción enzimática.

En nuestro primer ensayo seguimos el método expuesto, pero viendo la actividad en presencia o ausencia de dietilditiocarbamato  $10^{-3}$  M y con dos concentraciones distintas de enzima y sustrato. El catecol se prepara en disolución 2 mM en el mismo tampón; la de dietilditiocarbamato (que para abreviar, llamaremos DDC) es  $3 \cdot 10^{-3}$  M, de forma que poniendo 0,2 ml el medio de reacción quede  $10^{-3}$  M; de ácido ascórbico se



usan dos soluciones, una que contiene 2 mg/ y otra con diez miligramos por mililitro, que denominamos respectivamente A y B, empleando siempre un ml de una u otra. El tiempo de actuación del enzima es de 2 minutos. El ensayo arrojó el resultado que representamos en el cuadro siguiente:

<i>tampón</i>	<i>cateol</i>	<i>DDC</i>	<i>enzima</i>	<i>ascórbico</i>	<i>actividad</i>
4	—	0,2	1	1A	1,63
4	—	—	1	1A	1,68
3	1	0,1	1	1A	1,60
3	1	—	1	1A	1,63
4,9	—	0,2	0,1	1A	0,23
4,9	—	—	0,1	1A	0,28
3,9	1	0,2	0,1	1A	0,22
3,9	1	—	0,1	1A	0,26
4,9	—	0,2	0,1	1B	0,29
4,9	—	—	0,1	1B	0,29
3,9	1	0,2	0,1	1B	0,32
3,9	1	—	0,1	1B	0,33

A la vista de estos resultados se observa, en cuanto a la concentración de sustrato, muy poca influencia sobre la actividad, lo cual indica que con 1 ml de ácido ascórbico de concentración 2 mg/ml trabajamos prácticamente a saturación de sustrato. Parece ser excepción el caso en que hay presente DDC a gran concentración de sustrato, en cuyo caso la actividad es considerablemente mayor. En cambio la concentración de enzima es decisiva, como era de esperar. La presencia de catecol no influye prácticamente cuando el ascórbico es de concentración A y sólo un poco con el más concentrado. La influencia del DDC resulta completamente opuesta; si bien es pequeñísima, no debemos despreciarla en vista de su constancia cuando se trabaja a baja concentración de sustrato, mientras que al aumentar ésta desaparece dicha influencia.

En conjunto parece como si hubiera en el tejido más de un enzima capaz de oxidar el ácido ascórbico, pero de todas formas creemos que no debe tomarse muy en consideración la actividad fenolasa, en vista de lo poco que es capaz de influir la presencia de catecol y en cuanto a la ascórbico oxidasa tampoco parece ser muy considerable, pues es muy poco lo que es capaz de inhibir el DDC.

Tratando de penetrar algo en la naturaleza de la oxidación repetimos un ensayo de inhibición incluyendo, esta vez la oxina (8 oxiquinoleína) y el cianuro potásico capaces ambos de complejar el cobre y el hierro, sobre todo el último. El ensayo, al igual que el anterior, se realiza en flavedo de un fruto verde y se obtiene

	actividad	% de inhibición
sin inhibidores	0,65	—
con DDC	0,64	—
con oxina	0,64	—
con cianuro	0,05	92

estando todos los inhibidores a la concentración de  $10^{-3}$  M.

Se observa una inhibición prácticamente nula por parte del DDC y de la oxina, en vista de lo cual, parece lógico dejar de tomar en consideración el cobre y, con él, fenolasa y ascórbico oxidasa. Puesto que nunca hemos usado  $H_2O_2$ , no podemos pensar en peroxidasa; parece que debemos señalar hacia la citocromo oxidasa, aunque la concentración usada de cianuro debería inhibir más de lo que lo hace.

Peró resultó sorprendente que un ensayo realizado en un fruto de aproximadamente el mismo peso (14,5 g) del mismo árbol y, a los cuatro días exactamente del ensayo anterior obtuviéramos los siguientes resultados:

	actividad	% de inhibición
sin inhibidores	0,76	—
con DDC $10^{-3}$ M	0,65	14
con DDC $10^{-4}$ M	0,71	7,7
con CN <sup>-</sup> $10^{-3}$ M	0,06	92

en donde se ve que la inhibición por el DDC es considerable y que con cianuro lo es casi total. Comparado con el ensayo anterior la naturaleza de la oxidación es completamente diferente y, dada la semejanza de las muestras ensayadas, parece obligado admitir un estado dinámico del fruto en cuanto a la oxidación del ácido ascórbico, obedeciendo a factores que en nuestro trabajo no pueden controlarse por su naturaleza demasiado general, pero que invita a un estudio posterior y completo del ritmo endógeno en todas sus posibilidades.

Unos siete meses después de los ensayos anteriores, en verano de 1959, repetimos el ensayo de inhibición, esta vez con frutos de pesos variables, pensando en la posibilidad de qué dichas variaciones sean debidas a distintas etapas del desarrollo. Aparte las diferencias de pesos las demás circunstancias de las tres muestras eran exactamente iguales en cuanto a día, hora, y aspecto sano. En una de las muestras tratamos de invertir la inhibición por adición posterior de una sal de cobre, y otra de hierro:

peso total del fruto (g)	0,53	27	14
sin inhibidor	0,20	0,23	0,72
con CN <sup>-</sup>	0,00	0,00	0,00
con DDC	0,00	0,00	0,00

Donde sorprende la total inhibición con DDC.

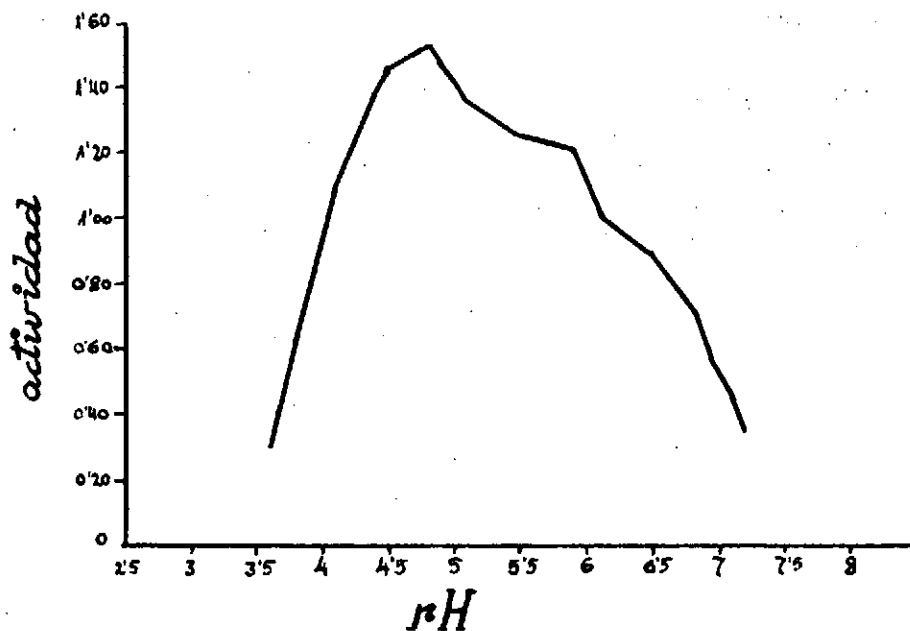
En el fruto de 14 g, que es el más activo, repetimos el ensayo con cianuro, pero agregando 0,2 ml de sulfato férrico  $5 \cdot 10^{-2}$  M y obtenemos una actividad de 0,53, o sea, que se restablece una gran parte de la actividad. Repetimos este último ensayo sustituyendo la sal férrica por sulfato de cobre de la misma concentración y resulta entonces una actividad extraordinaria de 1,88, pero este dato sólo significa que el cobre, de por sí, es capaz de catalizar la oxidación, lo cual era de presumir.

De los ensayos precedentes se deduce que las diferencias de sensibilidad al DDC no son debidas a distintas etapas del desarrollo del fruto. Concretamente en este último caso parece que se trata de ascórbico oxidasa.

Finalmente, y por lo que puede significar como dato aportado en este sentido realizamos un estudio de la actividad en relación al pH en uno de los casos en que la inhibición por el cianuro y el DDC es total. Los tampones se prepararon a base de ácido cítrico, fosfato monosódico y fosfato bisódico según SÖRENSEN (36) y McILVAINE (37) pero teniendo en cuenta que el extracto del enzima tiene un pH de 5,0 consideramos el pH que existe en el medio de reacción. Los resultados son:

pH del medio	consumo ensayo	consumo blanco	actividad
3,6	1,98	2,23	0,25
3,8	1,60	2,23	0,63
4,1	1,14	2,23	1,09
4,4	0,84	2,22	1,38
4,6	0,77	2,22	1,45
4,8	0,68	2,21	1,53
4,9	0,77	2,21	1,44
5,0	0,80	2,21	1,41
5,2	0,85	2,20	1,35
5,2	0,93	2,20	1,27
5,8	0,99	2,20	1,21
6,2	1,15	2,20	1,05
6,5	1,30	2,19	0,89
6,7	1,49	2,19	0,70
6,9	1,67	2,19	0,56
7,2	1,76	2,19	0,43
7,4	1,85	2,19	0,34

para dar más expresión a estos resultados los representamos gráficamente.



Puede observarse un máximo definido a pH 4,8. A la izquierda del máximo el descenso es regular y rápido, pero a su derecha aparece cierta irregularidad, a la que no nos atrevemos a atribuir significado alguno en vista de su poca magnitud. Conviene recordar a este respecto que para ascórbico oxidasa se ha observado hasta ahora, independientemente de su fuente y su pureza, un pH óptimo de alrededor de 5,6 (38) cuando se determina la actividad en tampón citrato-fosfato, que es el usado por nosotros. Para citocromo oxidasa se recomienda un pH de 7,0 (39), o sea, que la actividad que estamos observando nosotros no coincide en cuanto al pH óptimo con ninguna de las dos citadas. El óptimo hallado por nosotros se aproxima mucho al que se atribuye generalmente a fenolasa, pero ésto no deja de ser una coincidencia porque resulta que el ensayo lo hicimos en presencia y ausencia de catecol y los resultados obtenidos en presencia de catecol los hemos omitido por ser idénticos a los que hemos representado.

El descenso que se puede observar en los testigos es debido a la ligerísima destrucción que sufre el ácido ascórbico en solución, pero que no afecta, en absoluto, a nuestras determinaciones.

## ACTIVIDAD POR ZONAS Y ETAPAS DE LA VIDA DEL FRUTO

Finalmente, de una manera paralela a lo hecho con catalasa y peroxidasa, procedemos a un estudio de la variación de la actividad en distintas zonas del fruto y en diversos grados de madurez y desarrollo. En este estudio el método queda tal y como lo hemos expuesto al principio y sólo en algunos casos hemos realizado la reacción en presencia de catecol por ver si en alguna etapa llega a ser de consideración la actividad fenolasa, lo que en ningún caso observamos. En cuanto a la expresión de los resultados creemos conveniente aclarar que las valoraciones las realizamos con una bureta de 2 ml, graduada en centésima de ml. Por otra parte de todos los reactivos usados en cada determinación, la única medida que resulta verdaderamente crítica es la del ácido ascórbico, a pesar de lo cual no nos aventuramos a considerar aquellas actividades que correspondan a menos de 0,03 ml de solución de iodo.

Empezamos, como en las demás actividades, con un ensayo de tipo general realizado con frutos verdes de pesos distintos, ensayo realizado en invierno con los siguientes resultados:

<i>Peso del fruto</i>	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
12 g	1,12	1,32	1,8
20,5	0,58	0,64	0,10
29	0,23	0,28	0
49	0,13	0,12	0
65	0,12	0,15	0

de donde se deduce, en cuanto a las zonas, la ausencia de grandes diferencias entre flavedo y albedo, siendo en éste las actividades ligeramente superiores, lo cual supone un panorama completamente distinto a lo observado en las actividades catalasa y peroxidasa; las variaciones de actividad con el peso son regulares, tanto en corteza como en las otras zonas. Los sacos presentan en la primera etapa una actividad comparable, e incluso superior a la de las demás zonas, pero desciende muy bruscamente y ya en el fruto de 20,5 g su valor es muy inferior al de las demás zonas, anulándose completamente a partir de los 20 g.

En verano repetimos el ensayo con el siguiente resultado:

<i>Peso del fruto</i>	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
12 g	0,58	0,53	0,31
15	0,46	0,27	0,11
37	0,18	0,12	0,12
70	0,08	0,09	0,13

Se observa con respecto al ensayo anterior algunas analogías y diferencias; analogías en el sentido de que sigue habiendo un descenso gradual de la actividad en flavedo y albedo conforme aumenta el peso del fruto, y en que, en ambas zonas las actividades son de un orden parecido al de los frutos de invierno, excepto en el fruto de menor peso, a pesar de que es del mismo peso en ambos casos. La gran diferencia de este ensayo con respecto al anterior está en los sacos; cuando la actividad del flavedo en el primer ensayo era de 0,58 la de los sacos era de 0,1, mientras que en el último ensayo es de 0,31; en el primer caso, a partir de los 29 g los sacos carecían de actividad, mientras que en el segundo, aún los sacos de frutos de mayor peso, tienen una actividad que parece permanecer aproximadamente constante a partir de los 15 gramos.

Debemos considerar excepcional la actividad en el fruto de 12 g en el ensayo de invierno ya que corresponde a una etapa del desarrollo del fruto en que la actividad es extraordinaria. Recordemos que esto mismo podía deducirse de catalasa y peroxidasa y, también entonces vimos que quizá el peso del fruto pueda no ser una medida exacta de dicha etapa del desarrollo, por lo que no debe extrañarnos la gran diferencia observada en los dos frutos del mismo peso (12 g).

Para observar la influencia del grado de madurez realizamos un ensayo con frutos verdes desarrollados (A), verde amarillento (B), amarillo reciente (C), amarillo intenso (D) y fruto de árbol clorótico (E) con los siguientes resultados:

notación	flavado	albedo	sacos
A	0,2	0,4	0,11
B	0,04	0,06	0
C	0,04	0	0
D	0	0	0
E	0	0	0

o sea, que las actividades son muchísimo menores que las de frutos jóvenes. De todas formas mientras el fruto está aún verde la actividad sigue siendo digna de tener en cuenta. En los casos restantes, es difícil hacer comparaciones porque los resultados se encuentran en las proximidades del error experimental permitido. Por ello hemos realizado otro ensayo paralelo a éste, pero dejando actuar el enzima durante cinco minutos, en lugar de dos:

notación	flavado	albedo	sacos
A	0,30	0,38	0,10
B	0,06	0,09	0,04
C	0,05	0,07	0,06
D	0,05	0,05	0,04
E	0	0,05	0,04

hemos ganado un poco en sensibilidad, pero, aun así, los valores siguen siendo muy bajos. En adelante los ensayos con frutos amarillos los haremos con cinco minutos de actuación, pero nos abtendremos de abusar de las comparaciones.

En conjunto puede deducirse que al tomar el fruto su color amarillo casi desaparece la capacidad para oxidar el ácido ascórbico y no parece hacerlo de una forma gradual, pues en los dos ensayos con frutos adultos se observa un salto brusco a pasar del verde al verde amarillento.

Hasta qué punto vale la pena tener en cuenta las pequeñas actividades encontradas con frutos maduros es algo difícil de aclarar. Una actividad de 0,05, por ejemplo, supone un consumo de 0,05 ml de iodo 0,01 N en cinco minutos, lo que equivale a 2,8 microlitros de oxígeno en dicho período, de 16,8 al cabo de 30 minutos y ésto para 0,1 g. de material, luego para 1 gramo sería de 168 microlitros de oxígeno en c.n. Cuando veamos los resultados obtenidos en los estudios sobre respiración comprobaremos que el tejido normalmente consume oxígeno en cantidades menores que ésta. Por otra parte, hay razones para pensar que, al menos en frutos jóvenes de la actividad encontrada por nosotros, sólo opere «in vivo» una fracción muy pequeña, pues el mayor valor encontrado para ascórbico oxidasa es de 1,8 en los sacos de un fruto muy joven, lo que

equivale a un consumo de oxígeno de unos 6.000 microlitros por 1 g de material durante treinta minutos, mientras que el mayor valor de respiración, hallado también en sacos de un fruto muy joven, es de 98 microlitros.

El resto de las medidas realizadas se corresponde bastante bien con lo establecido en estas líneas generales, encontrando solamente tres excepciones correspondientes a frutos jóvenes con actividad nula o casi nula. Son:

	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
fruto de 15 g	0	0,06	0
» de 42	0	0	0
» de 28	0	0,08	0

como en estos frutos no observamos enfermedad o cualquier otra anomalía nos resulta difícil hallar una explicación satisfactoria para tan baja actividad; también hemos hallado frutos verdes desarrollados y sin actividad (frutos de 97 y 100 g). De todos ellos los de 15, 42, 97 y 100 g se estudiaron entre el 15 de noviembre y el 15 de enero de los años 1958, 59 y 60, pero no debe adscribirse la baja actividad de una manera general a la época del año, pues disponemos de ensayos realizados alrededor de las fechas indicadas y que caen dentro de las normas generales:

	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>	<i>película</i>
fruto de 13 g	1,1	1,36	0,76	
» de 14 g	0,17	0,30	0,05	0,35
» de 24 g	0,85	0,91	0,37	
» de 80 g	0,35	0,23	0	

En cambio, fuera de las fechas citadas nunca se ha encontrado frutos que presentaran tales anomalías. Entre los frutos verdes tenemos:

	<i>flavado</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>	<i>película</i>
fruto de 18 g	0,67	0,52	0,11	
» de 25 g	0,52	0,26	0	
» de 37 g	0,12	0,13	0,13	0,43
» de 60 g	0,13	0,22	0	
» de 62 g	0,06	0,08	0	0,11

y en frutos adultos, con cinco minutos de actuación:



	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>	<i>película</i>
1.º	0,13	0,18	0,11	0,16
2.º	0,14	0,15	0,10	
3.º	0	0,11	0	0,08
4.º	0,04	0,12	0	0
5.º	0,11	0,08	0,07	0,08
6.º	0	0,1	0,05	0,07
7.º	0,04	0,12	0,05	

A lo largo de las series se comprueba que en limones verdes la mayor actividad se encuentra variablemente en el flavedo o el albedo, mientras que en frutos adultos parece claro el predominio del albedo sobre el flavedo. En algunos casos se ha estudiado también la película carpelar y su actividad, aunque variable, se asemeja a la de las dos zonas exteriores.

## RESPIRACION

Para el estudio de la respiración se ha usado el aparato Warburg, lo que permite el empleo de poca cantidad del material a estudiar, haciendo así posible una distinción entre las zonas del fruto.

Son muchas las técnicas empleadas cuando se han realizado estudios sobre respiración con este aparato, teniendo aplicación cada una de ellas para un objetivo distinto. Nosotros no pretendemos estudiar algún sistema enzimático concreto ni ver la capacidad del tejido para respirar un sustrato determinado, sino observar, en general, la intensidad respiratoria en condiciones lo más parecidas posible a las naturales del fruto y usando éste de sus propios sustratos, por lo que utilizamos la técnica de las placas de tejido. El mayor inconveniente de esta técnica radica en el fenómeno desde hace mucho tiempo admitido de que al practicar una escisión en el órgano la respiración se hace bastante mayor debido, según demostró Scott (40) no a la mayor entrada de oxígeno, sino a la menor acumulación de  $\text{CO}_2$  en el interior del tejido.

El método, introducido por OTTO WARBURG, consiste en preparar placas del material lo suficientemente delgadas para permitir que el oxígeno del medio alcance lo mejor posible las capas interiores por difusión, pero lo suficientemente gruesa para que la proporción de células rotas por el corte sea mínimo. Las placas se suspenden en un medio apropiado y se incuban, con agitación, a una temperatura determinada.

El primer problema es, pues, preparar dichas placas con un espesor adecuado. Los factores que fundamentalmente influyen aquí son la velocidad de difusión del oxígeno y la velocidad de respiración. Esta última

es particularmente baja y, por ello, recurrimos a un espesor de placa relativamente grande: 1 milímetro. En realidad, atendiendo a la velocidad de la respiración debería usarse un espesor aún mayor pero en ese caso no podríamos asegurar una buena penetración del oxígeno en el interior. Esta técnica se ha empleado en el estudio de flavedo y albedo; la película que rodea los sacos tiene un espesor menor y la hemos usado directamente y, en cuanto a los sacos, el problema es distinto porque, si bien el espesor es mayor de un milímetro, cualquier corte supone la rotura total de la estructura, por lo que lo hemos usado en su forma natural en lo que, por otra parte, no debe haber grave inconveniente, pues dada su composición, la difusión no debe ser aquí un problema serio. Es correcto el espesor de 1 milímetro para el flavedo en el sentido de que es, con bastante aproximación, el que tienen normalmente.

En estas condiciones establecidas la respiración disminuye con el tiempo lentamente y de una forma gradual, lo que comprobamos haciendo lecturas periódicamente. Aunque la observación de cada muestra dura una hora resulta más correcta la realizada a los treinta minutos, durante cuyo intervalo de tiempo la disminución de la respiración es nula o casi nula; ello supone el inconveniente de que, dada la poca intensidad de respiración observada, el dato resulta numéricamente menor y, por tanto, el error relativo se hace mayor, pero, en cambio, se evitan las diferencias de ritmo observadas cuando transcurre demasiado tiempo.

Se han usado 8 matraces midiendo previamente sus respectivos volúmenes adicionados del correspondiente al tubo manométrico acoplado a cada uno y hasta la marca de 150. Las placas se colocaban en 3 ml del líquido suspensor y en el receptáculo interior se ponían 0,3 ml de solución de KOH al 10 %. En el caso de no usar KOH se ponían 3,3 ml de líquido suspensor, con lo que siempre el volumen de la fase líquida era de 3,3 ml y, conociendo el volumen total, determinamos la constante para cada matraz por la fórmula (41)

$$k = \frac{V_g \frac{273}{T} - V_f \alpha}{P_0}$$

en la que

$V_g$  = volumen de la fase gaseosa

$T$  = temperatura absoluta, en nuestro caso 298° K

$V_f$  = volumen de la fase líquida = 3,3

$\alpha$  = solubilidad del gas considerado en el líquido

$P_0$  = presión standard, que con la solución de BRODIE, usada por nosotros, cuya densidad es de 1,033 resulta ser de 10.000 mm.

Los gases que vamos a medir son oxígeno y dióxido de carbono, para los cuales los valores de  $\alpha$  son respectivamente 0,027 y, aproximadamente 0,7 (42), con lo que el valor de las constantes para cada matraz resulta ser:

<i>matraz</i>	<i>volumen total</i>	$K_{O_2}$	$K_{CO_2}$
8236	14,7	1,053	1,275
8194	14,5	1,035	1,257
8081	13,47	0,941	1,163
8219	12,71	0,871	1,093
8215	14,6	1,044	1,296
8223	13,55	0,948	1,170
8469	15,3	1,108	1,330
8245	14,5	1,035	1,257

los volúmenes de los frascos se determinaron por el sistema de llenado con mercurio y pesada de éste (43).

Queremos insistir en la temperatura a que hemos hecho nuestras medidas y que es de 25° C. Interesa esta observación, porque se ha demostrado que el cociente respiratorio varía con la temperatura. Así, GERBER (44) ensayando con uva obtuvo los siguientes datos:

<i>temperatura</i>	0-20°	20°	30°	35°
<i>cociente respiratorio</i>	0,7	1,0	1,2	1,6

Para determinar el  $CO_2$  hemos seguido el método directo de WARBURG (45) y, por lo tanto, calculamos el  $O_2$  consumido por la fórmula  $x = h \cdot k_{O_2}$ , donde  $h$  es la diferencia de lecturas manométricas al principio y al final de la operación en el matraz que contiene KOH, mientras que para calcular el  $CO_2$  usamos la fórmula

$$x = \left[ h - \frac{X_{O_2}}{K_{O_2}} \right] K_{CO_2}$$

donde  $h$  significa ahora la diferencia de lecturas inicial y final en el matraz que no contiene KOH, teniendo en cuenta el signo, y las constantes  $K_{O_2}$  y  $K_{CO_2}$  son también las correspondientes al matraz sin KOH. Como termobarómetro hemos usado casi siempre el matraz n.º 8245.

Los resultados los expresaremos en microlitros de oxígeno o de anhídrido carbónico en treinta minutos.

Respecto del método quedan por aclarar el líquido suspensor adecuado y el posible uso de tampones. En cuanto al líquido suspensor empe-

zamos con un ensayo con la película de los sacos usando como líquido, agua, solución fisiológica de  $\text{ClNa}$  y ninguno, en ambos casos con y sin  $\text{KOH}$ . Los resultados fueron:

	$\text{O}_2$ consumido	$\text{CO}_2$ desprendido
con solución fisiológica	17	19
con agua	17	20
sin líquido suspensor	18	20

Como se ve, las diferencias que se observan caen dentro del error experimental permitido, que es, aproximadamente, de 1 ó 2 microlitros. El uso de película en este ensayo puede no ser el más adecuado porque en él no se ha tenido que hacer disección y, por ello, los fenómenos osmóticos tendrán menos valor. Procedimos, pues, a hacer un ensayo análogo con flavedo:

con solución fisiológica	50	54
con agua	56	61
sin líquido	35	43

Aquí las diferencias son bien notorias y nos indican que el medio que usemos nos influirá bastante en los resultados. Descontando el ensayo hecho sin líquido, que tiene todas las desventajas teóricas y prácticas, tenemos el problema de elegir entre la solución fisiológica y el agua. La primera tiene la desventaja de la posible influencia de los iones  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Na}^+$  sobre la marcha de la respiración; el agua, por su parte, ofrece el peligro de un intercambio osmótico excesivamente elevado, que llevaría consigo un cambio considerable en la estructura de la célula. Pensamos que si las diferencias anteriores las observamos en el tejido seccionado y no en el intacto (ensayo con película) el factor osmótico jugaría un papel de consideración, por lo que nos decidimos por el uso de la solución fisiológica, que es la que, en este sentido, se aproxima más a la célula natural. Es cierto que con agua respira más, pero ello puede ser debido tanto a inhibición por parte de la sal como a excesiva traslocación de los sustratos respiratorios.

En cuanto a la influencia de pH del medio hicimos un ensayo con varios tampones fisiológicos a distintos pH. Omitimos transcribir aquí los resultados por su carencia de significado, lo cual es lógico, puesto que medido el pH de los líquidos después de la operación resultó completamente distinto del inicial. Por ello renunciamos a cualquier pH que no sea el natural del tejido y usamos simplemente la solución fisiológica del cloruro sódico.

Procedemos a continuación al desarrollo de nuestro estudio, que consta de dos partes:

Sobre la respiración en distintas etapas del desarrollo y la maduración y en las distintas zonas del fruto.

Sobre la naturaleza de la respiración,, principalmente por observación de la influencia de sustancias extrañas, incluyendo en ellas los clásicos inhibidores respiratorios.

#### RESPIRACIÓN POR ZONAS Y ETAPAS

La respiración en cada una de las zonas del limón presenta una gradación que va de mayor a menor intensidad al pasar del flavedo a los sacos en los frutos maduros y en sentido inverso en frutos jóvenes, hallándose la etapa de transición en la época en que los sacos se van cargando de jugo ácido. Respecto de las etapas del desarrollo resulta difícil establecer una gradación parecida, pues de unos días a otros la respiración varía considerablemente en frutos de igual madurez y en las mismas condiciones. Observemos dos ensayos realizados con un intervalo de 12 días con tres frutos cada vez y estudiando el consumo de oxígeno y el desprendimiento de dióxido de carbono.

1.º ensayo.—Flavedo de frutos verde amarillento (A), amarillo reciente (B) y amarillo muy pálido de un fruto de árbol clorótico (C).

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
A	12	36	3
B	10	26	2,6
C	8	22	2,75

2.º ensayo.—Frutos análogos, excepto el C. que aquí se trata de un fruto amarillo intenso y sano. Los resultados son:

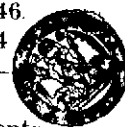
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
A	47	66	1,4
B	47	71	1,5
C	34	41	1,2

Entre A y B no se observan diferencias fundamentales en el consumo de oxígeno, pero la respiración es mucho mayor en el segundo caso que en el primero, mientras que los cocientes respiratorios son mucho menores en el segundo caso. En cualquier caso los cocientes están siempre por encima de la unidad, lo cual será la norma general para frutos maduros. El valor menor en el fruto clorótico no puede juzgarse comparativamente, porque se trata de un fruto cogido de árbol distinto.

Nos encontramos, pues, aquí el mismo fenómeno observado en actividades enzimáticas, sobre todo catalasa y peroxidasa, lo que hace imposible relacionar seriamente ensayos realizados en días diferentes. Por lo demás, de los ensayos anteriores no puede deducirse una influencia considerable de la presencia de clorofila sobre la respiración ni una actividad fotosintética en los frutos que, aunque verdes, están ya plenamente desarrollados. En frutos jóvenes no podemos juzgar de la misma manera y los valores de respiración del flavedo deben aceptarse con el siguiente reparo.

En cuanto al estudio comparativo de las distintas zonas en fruto maduro podemos juzgar a partir de dos ensayos realizados en distintas fechas:

1.º)	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
flavedo	32	47	1,46
albedo	7	17	2,4
sacos	0	16	—
2.º)	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
flavedo	45	54	1,2
albedo	8	15	1,87
sacos	4	18	4,5



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
BIBLIOTECA

o sea, que el consumo de oxígeno del flavedo supone la mayor parte del consumido por el fruto total y la disminución de la capacidad para consumirlo es gradual conforme nos adentramos en el fruto, pudiendo llegar al valor cero en los sacos. La respiración total, juzgada por el dióxido de carbono desprendido es también mayor en flavedo, pero en albedo y sacos ya no resulta tan baja y tampoco puede decirse que sea mayor en albedo que en sacos, como ocurre con el consumo de oxígeno. En cuanto al cociente respiratorio, BIALE y YOUNG (46) que estudian respiración a varias concentraciones de O<sub>2</sub> aseguran que en la mayoría de los tratamientos es considerablemente menor que la unidad, mientras que en nuestros ensayos los valores más bajos, correspondientes al flavedo, son siempre mayores que la unidad y, con mayor razón en las zonas interiores, desde el oxígeno consumido resulta despreciable, comparado con el CO<sub>2</sub> desprendido, resultando cocientes que varían desde aproximadamente 2 hasta infinito, cuando no se observa consumo de oxígeno por los sacos.

Si parece lógica la incapacidad de los sacos para la respiración aerobia, en cambio en frutos jóvenes no resulta así, sino que presentan valores de consumo de oxígeno muy elevados. Puede pensarse que, debido a la poca permeabilidad de la piel, en el fruto entero la respiración será más bien anaerobia, pero con una gran capacidad para adaptarse a las condiciones

aerobias. Esta sería la deducción más cómoda, pero la realidad es que no conocemos exactamente la accesibilidad del oxígeno a las capas interiores del fruto, teniendo en cuenta que el gas no ha de penetrar necesariamente a través de la piel, sino que puede entrar más o menos disuelto en la savia. Para un fruto de 15 gramos encontramos:

	O <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub>	cociente
flavado	30	19	0,63
albedo	30	23	0,76
sacos	45	45	1,0

El valor del flavado será más o menos representativo, pero es indudable la gran capacidad respiratoria de los sacos en esta etapa. En casi todos los sentidos los valores encontrados aquí son diametralmente opuestos a los hallados en frutos adultos; así, la capacidad para el consumo de oxígeno aumenta al penetrar en las capas interiores, lo mismo que el desprendimiento de anhídrido carbónico y los cocientes respiratorios aparecen ser menores que la unidad, excepto en sacos, en que vale 1. El único denominador común a frutos jóvenes y adultos es que el cociente respiratorio es siempre mayor al penetrar en el interior.

Al disminuir el peso del fruto la actividad se va elevando y en frutos de 9,8 gramos resulta:

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
flavado	38	26	0,68
albedo	47	39	0,83
sacos	87	88	1,0

Sigue aumentando la respiración de los sacos con respecto a las demás zonas y sigue estacionado su cociente respiratorio en la unidad. Parece lógico deducir que en frutos jóvenes la zona de los sacos está sometida a una actividad metabólica muy elevada y que el sustrato respiratorio consiste exclusivamente en azúcares; en las restantes zonas el cociente sigue siendo menor que la unidad.

Por razones ya citadas varias veces no debemos comparar la magnitud de la respiración en los dos ensayos anteriores por tratarse de frutos cogidos en días distintos. En este sentido realizamos un ensayo con sacos de frutos de pesos gradualmente crecientes observando el consumo de oxígeno:

peso del fruto en g	9	20	27	58
O <sub>2</sub> consumido	46	42	37	24



o sea, que aún en un fruto de 58 g, que se encuentra en la mitad de su desarrollo, el consumo de oxígeno sigue siendo considerable; en este caso, aproximadamente el 50 % del fruto de menor peso.

No es fácil determinar exactamente cuál sea el momento en que se presenta el descenso brusco y definitivo de la respiración de los sacos, porque tiene lugar cuando el fruto es aún verde y los frutos verdes sólo podemos juzgarlos por el peso, lo cual, sobre todo en un estado avanzado de desarrollo, no puede ser un índice exacto del grado de desarrollo y de la proximidad de la maduración, pues el peso de los frutos que empiezan a madurar, de entre los ensayados por nosotros, oscila entre los 80 y los 160 gramos aproximadamente. Poseemos datos sobre dos frutos verdes de 105 y 116 gramos y que ayuda un poco a localizar dicho cambio:

Fruto de 105 g	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
flavado	32	37	1,15
albedo	20	18	0,9
sacos	15	22	1,47
Fruto de 116 g	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	cociente
flavado	49	53	1,08
albedo	19	17	0,9
sacos	5	11	2,2

En el primero los sacos consumen el 47 % del oxígeno consumido por la corteza, mientras que en el segundo sólo es el 10 % y el valor de este último se va aproximando bastante al de los frutos amarillos.

Es digno de notar que en los frutos verdes, aun estando ya desarrollados, el cociente respiratorio aún no ha experimentado el aumento necesario para llegar al del fruto maduro, lo cual parece ser un fenómeno propio de la madurez. Ni siquiera en el fruto de 116 g, en el que los sacos ya han experimentado el descenso más considerable, llega a ser sensiblemente mayor que la unidad, excepto en los propios sacos, pero en éstos resulta lógico teniendo en cuenta que el consumo de oxígeno ha descendido mucho.

En nuestros estudios sobre el uso de atmósfera de nitrógeno y de inhibidores pueden observarse más datos relativos a la actividad en las distintas zonas y etapas.

## NATURALEZA DE LA RESPIRACIÓN

En primer lugar y con respecto al uso de una solución fisiológica de ClNa nos hemos interesado por conocer la influencia de algunos iones sobre el consumo de oxígeno, para lo cual hemos usado un fruto maduro y de él el flavedo. El líquido suspensor ha sido agua y soluciones fisiológicas de dos aniones y cuatro cationes. Los resultados obtenidos son los siguientes:

solución de	—	ClNa	ClK	SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> Mg	SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub>
O <sub>2</sub> consumido	56	50	23	28	35	36

Efectivamente se observan diferencias bastantes notables difíciles de asignar a iones aisladamente; así, el menor consumo corresponde a la disolución de ClK, pero no puede considerarse debido al ión Cl<sup>-</sup>, puesto que con ClNa respira mucho más; en todo caso al ión K<sup>+</sup>, pero entonces no tendría explicación el que con SO<sub>4</sub>K<sub>2</sub> diera lugar a un consumo considerablemente mayor. Las mismas consideraciones pueden hacerse con respecto a los demás aniones y cationes. Se podría pensar en estudiar series de un catión y distintos aniones y viceversa, pero incluso esto parece significar poco, puesto que de la serie de sulfatos usados podría deducirse el orden  $K \approx Mg > Na$ , mientras que de los dos cloruros considerados se deduciría  $Na > K$ . En resumen, el problema parece ser mucho más complejo, pero las diferencias son indudables y, por ahora sólo asignables a una sal determinada y no a un ión.

Hemos llevado a cabo un ensayo paralelo, pero con sustancias que de una manera más o menos directa están relacionadas con los tratamientos del fruto. Se trata del ión Mn<sup>+2</sup> (en forma de sulfato), que está relacionado con un tipo especial de clorosis, y la tiurea y el ácido indolilacético, que han sido usados como conservantes, aunque con acciones distintas. Estas tres sustancias se han empleado en solución acuosa 10<sup>-3</sup> M y se han obtenido los siguientes resultados:

O <sub>2</sub> consumido	60	61	60	59
CO <sub>2</sub> desprendido	92	93	93	92

Esto resultados parecen autorizar a deducir que la influencia de las sustancias en estudio sobre la respiración es nula, dentro del error experimental. Conviene recordar a este respecto que el ácido indolilacético ha sido usado otras veces (47) en distintos materiales y de los resultados obtenidos parece poder deducirse que incrementa la respiración, aunque no

hay acuerdo total a este respecto. Iones del tipo del  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$  los hemos ensayado comparativamente con fruto fresco y fruto almacenado durante 20 días; los resultados pueden observarse a continuación:

Fruto fresco	agua	ClNa	SO <sub>4</sub> Cu	SO <sub>4</sub> Fe	SO <sub>4</sub> Mn	10 <sup>-3</sup> M
O <sub>2</sub> consumido	34	32	30	14	22	
Fruto almac.	agua	ClNa	SO <sub>4</sub> Cu	SO <sub>4</sub> Fe	SO <sub>4</sub> Mn	
O <sub>2</sub> consumido	18	18	19	14	19	

Los valores no resultan concordantes en cuanto al manganeso y el hierro, que son los iones que parecen tener influencia. En realidad, aparte del efecto propio del ión, estos datos sólo pueden tener un valor relativo porque al menos el problema de permeabilidad del tejido para el ión ha de tener una influencia decisiva en los resultados obtenidos. Algo de ello puede juzgarse observando los valores de oxígeno consumido en tiempos sucesivos y hallamos para la sal de manganeso en el ensayo con fruto fresco durante los primeros 15 minutos un consumo de 15 microlitros, mientras que entre los 15 y los 30 minutos es de 7; entre los 30 y los 45 de 5 y entre los 45 y los 60 de 3. Esta disminución tan rápida demuestra que el valor global que podamos obtener en nuestros ensayos deja de tener en cuenta un problema fundamental de la fisiología de los tejidos, como es la penetración de los iones.

El uso de la atmósfera de nitrógeno tiene un significado bastante interesante, aunque hay que tener en cuenta a la hora de extraer conclusiones que, aparte de la capacidad del tejido en un momento determinado para respirar anaeróbicamente, existe también el problema de su capacidad de adaptación a unas condiciones que no son las suyas habituales, por lo que vale la pena observar los resultados a lo largo del tiempo; pero el tiempo de observación no puede ser muy grande porque el tejido no puede conservar por mucho tiempo su vitalidad y de ahí nuestras limitaciones. Por otra parte, la ausencia de nitrógeno no impide la fotosíntesis, por lo que los ensayos referentes a flavedos de frutos verdes no podemos tomarlos muy en consideración, sobre todo cuando se trata de frutos muy jóvenes en período de desarrollo, en que la actividad fotosintética puede ser mayor.

Empezamos con un ensayo elemental hecho con un fruto adulto normal en sus distintas zonas y resulta:

	C <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub>
	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
CO <sub>2</sub> desprendido	60	16	18

Como era de esperar, incluso en estas condiciones, la mayor actividad corresponde al flavedo, pero es de notar que, en conjunto, los valores no son muy diferentes de los obtenidos en condiciones aerobias. Esto para albedo y sacos sobre todo para estos últimos, no supone nada anormal porque es de presumir que habitualmente actúen con una atmósfera muy enrarecida en oxígeno; en cambio en el caso de flavedo supone una capacidad de adaptación muy elevada. De todas formas un ensayo realizado con un fruto aislado puede no responder a la generalidad y resultará más significativo, en cuanto a la presencia o ausencia de oxígeno, estudiar la misma muestra en las dos circunstancias para poder comparar. Realizado este ensayo arroja los siguientes valores:

flavedo; aerobia	39	49
» anaerobia	—	45
sacos; aerobia	4	7
» anaerobia	—	6

donde se observa que no es muy grande la diferencia de dióxido de carbono desprendido, tanto en flavedo como en sacos, aunque, en realidad, en estos últimos los valores son tan pequeños que no permiten aventurarse en conclusiones.

El problema de la adaptación puede complicarse con el de las reservas de metabolitos respirables dentro de la célula; éste último queda lejos de nuestro control y, al mismo tiempo puede dificultar un control del primero. Reproducimos el estudio con flavedo del caso anterior, pero observando los valores a intervalos de 15 minutos:

en aire	20	25	19	24	19	23	18	22
en N <sub>2</sub>	—	24	—	20	—	17	—	15

luego parece que no es problema de adaptación desde el momento en que durante los primeros 15 minutos el dióxido de carbono desprendido en condiciones anaerobias es máximo, siendo aproximadamente igual al mismo dato en condiciones aerobias, mientras que en presencia de oxígeno el ritmo de desprendimiento de O<sub>2</sub> podemos considerarlo constante con bastante aproximación y, en cambio, en ausencia de oxígeno va disminuyendo de una manera indudable. Esto puede significar que en el tejido quede retenido algún oxígeno que prolongue algo la respiración, al menos mientras dure éste y al acabarse se vaya debilitando, pero esto no es probable porque desde el principio la tensión del oxígeno en los tejidos es baja y si se tiene en cuenta que mientras se pasa oxígeno el tejido está respirando y desprendiendo CO<sub>2</sub> lo más probable es que este CO<sub>2</sub>

sea el que constituya la atmósfera interior de la célula. Debemos advertir que se recomienda normalmente pasar corriente de nitrógeno durante unos cinco minutos, pero nosotros lo hacíamos durante diez minutos. DONNY y SCOTT (48) demostraron una gran capacidad de los tejidos para retener el  $\text{CO}_2$  y dificultar el acceso de oxígeno. Según éste, del ensayo anterior se puede deducir más bien lo contrario de una adaptación paulatina del tejido a las condiciones anaerobias, o sea, una adaptación inmediata y después un descenso gradual de la respiración en dichas condiciones. Esto podría significar que una atmósfera de nitrógeno acabaría pronto con la respiración debida al tejido intacto, independientemente de que al perder frescura y, sobre todo, al desarrollarse microorganismos aparecieran otros tipos de respiración, pero con nuestra técnica resulta imposible comprobar dicha posibilidad.

Renunciamos a transcribir los datos obtenidos con sacos en tiempos sucesivos por caer todos ellos dentro del error experimental.

En frutos jóvenes el problema de la respiración anaerobia aparece completamente distinto. Partimos, en primer lugar, de un fruto de 10 gramos, que es el límite inferior de tamaño para poder considerar ya formado el fruto. Resultó:

	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
$\text{CO}_2$ desprendido	0	2	18

y un fruto del mismo tamaño, pero actuando en presencia de oxígeno

	<i>flavedo</i>	<i>albedo</i>	<i>sacos</i>
$\text{CO}_2$ desprendido	27	39	90

Puesto que se trata de dos frutos distintos, no podemos deducir que en condiciones aerobias los sacos desprendan menos  $\text{CO}_2$ , además de que la diferencia es relativamente pequeña, pero no hará falta insistir en la extraordinaria actividad de los sacos comparada con las demás zonas. Del ensayo en condiciones anaerobias no podemos deducir inmediatamente que el flavedo no respira en dichas condiciones, porque aún queda la posibilidad de que la actividad fotosintética sea tan grande que consuma el  $\text{CO}_2$  a una velocidad mayor que la de su producción, lo cual no parece muy probable porque el albedo es incapaz de fotosintetizar y, en cambio, en ausencia de oxígeno, su capacidad de respiración es prácticamente nula. Esto sería cómodo atribuirlo a la inaccesibilidad del oxígeno a las zonas interiores de los sacos si no fuera porque en condiciones anaerobias los sacos también respiran mucho más que las demás zonas y

porque el albedo, que también está en el interior del fruto, no responde al medio anaerobio.

Puesto que en alguna etapa de la vida del fruto ha de producirse una inversión de la actividad metabólica relativa de las zonas procedemos a ensayar con frutos de tamaño algo mayor. En uno de 17,5 g ensayado en sus tres zonas en presencia y ausencia de oxígeno resulta:

	<i>flavado</i>		<i>albedo</i>		<i>sacos</i>	
	<i>anaer.</i>	<i>aer.</i>	<i>anaer.</i>	<i>aer.</i>	<i>anaer.</i>	<i>aer.</i>
CO <sub>2</sub> desprendido	11	24	20	66	53	

Existe paralelismo en cuanto al orden de la capacidad para la respiración anaerobia en las distintas zonas, pero las diferencias son ya bastante menores y nos hallamos, por lo tanto, en un estado de transición. En el estudio enzimático vimos que en la etapa de 9-11 g, en que se va perfilando o se acaba de perfilar la zona de los sacos, la actividad metabólica de dicha zona era muy grande y conforme va haciendo su aparición el almacenaje de ácidos en dicha zona la actividad disminuye bruscamente. En cuanto a la respiración el panorama es parecido, pero aquí el descenso de actividad no es tan brusco y, por otra parte, el flavado y el albedo presentan una actividad pequeñísima.

Pasamos de aquí a un fruto de 63 g y se observa:

	<i>flavado</i>		<i>albedo</i>		<i>sacos</i>	
	<i>anaer.</i>	<i>aer.</i>	<i>anaer.</i>	<i>aer.</i>	<i>anaer.</i>	<i>aer.</i>
CO <sub>2</sub> desprendido	38	18	22	6	20	

aunque el fruto está verde aún y le falta bastante para su completo desarrollo nos encontramos ya en la etapa en que los sacos no están capacitados para la respiración aerobia; el albedo mantiene su postura general de intermedio entre flavado y sacos y el flavado está ya más capacitado que las demás zonas para la respiración aerobia.

Obsérvese que en este último ensayo los cocientes CO<sub>2</sub> anaerobio/CO<sub>2</sub> aerobio son bastante mayores que la unidad y, por lo tanto, en esta época es indudable que opera el efecto PASTEUR.

#### INHIBIDORES

Hemos centrado el uso de inhibidores lo más posible en el fruto maduro y, de él, en el flavado, que es la zona donde se localiza la mayor parte de la respiración. En primer lugar estudiaremos el efecto del cianuro; en los ensayos en que no se especifica la concentración usada, es de

10<sup>-3</sup> M. Empezamos con un fruto de apariencia normal y de una madurez reciente; al mismo tiempo aprovechamos el ensayo para estudiar un fruto con clorosis aguda. Los ensayos se hacen en presencia y ausencia del inhibidor:

	O <sub>2</sub> % inhib.	CO <sub>2</sub> % inhib
fruto normal con CNK	12      37	30      12
»    »    sin CNK	19      —	34      —
»    »    con CNK	9       59	33      15
»    »    sin CNK	22      —	39      —

La intensidad de la respiración, como se ve, no difiere mucho del fruto normal al afectado de clorosis, tanto en el oxígeno consumido como en el dióxido de carbono desprendido y, por ello, en el cociente respiratorio. El efecto del cianuro sobre el desprendimiento de CO<sub>2</sub> es bastante pequeño; la inhibición del consumo de oxígeno existe, como era de esperar, pero lo sorprendente es que afecte más al fruto clorótico que al normal, cuando aquel se caracteriza por una deficiencia iónica. De todas formas no constituye ello una prueba rigurosa de que el hierro o el manganeso no intervengan en la respiración del limón, pero recuérdese que estos iones tienden en general a reprimir el proceso respiratorio.

En realidad el uso de inhibidores respiratorios presenta el problema de su penetración en el interior del tejido, lo que requiere algún tiempo, y el de una posible adaptación, con el tiempo a los sistemas respiratorios insensibles al cianuro. El primer problema no parece ser de gran importancia por la gran capacidad del ácido cianhídrico para penetrar en el tejido. Nosotros, normalmente, ponemos la solución de CNK directamente en el líquido suspensor antes de cerrar el matraz, con lo cual, cuando se empieza a tomar lecturas el cianuro ya está durante 10 minutos en contacto con el tejido, pero en una prueba comparativa hecha de esta forma (A) y poniendo el cianuro en la rama lateral para verter inmediatamente antes de hacer lecturas (B) se obtienen los resultados siguientes:

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
(A)	17	28
(B)	17	29

o sea, que no parece haber problema en este sentido.

En cuanto a la adaptación al inhibidor, veamos antes el caso del dietildicarbamato sódico (DDC), específico del cobre:

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
(A) sin inhibidor	24	32
(B) con cianuro	20	44
(C) con DDC	20	41

La inhibición es pequeña; menor que la obtenida en el ensayo anterior, siendo también pequeña la actividad, aún en ausencia de inhibidores. Lo verdaderamente curioso de este ensayo es un mayor desprendimiento de CO<sub>2</sub> en el caso de presencia de inhibidores, lo cual no se ha vuelto a repetir en ningún ensayo; a lo sumo, en algunos casos son iguales ambos valores. No vemos una interpretación clara de este fenómeno, pero quizás sea algo análogo a un efecto PASTEUR, en cuyo caso la presencia de cianuro se correspondería con la ausencia de aire en las medidas anaerobias.

Respecto de una posible adaptación gradual de los tejidos creemos oportuno reproducir los valores en los ensayos con ambos inhibidores a intervalos de 15 minutos:

intervalo	O <sub>2</sub> (B)	O <sub>2</sub> (C)	CO <sub>2</sub> (B)	CO <sub>2</sub> (C)
0-15	10	10	23	23
15-30	10	10	21	18
30-45	10	10	19	15
45-60	10	9	17	13
60-75	10	9	16	12
75-90	10	9	15	11

Resulta que, en cuanto al consumo de oxígeno, ambos inhibidores presentan una constancia que en un intervalo de 90 minutos nunca se observa en ausencia de los mismos. El CO<sub>2</sub> desprendido, en cambio, disminuye gradualmente, más en el caso del DDC, lo que hace que el cociente respiratorio varíe en dicho intervalo desde 2,3 hasta poco más de la unidad. Recuérdese que en medio anaerobio también se observaba esta disminución rápida del desprendimiento de CO<sub>2</sub>.

Hemos de tener presente que estos ensayos con inhibidores los hacemos siempre con flavedos de frutos amarillos dentro de las dos horas de haberlos cogido y partiendo del mismo árbol, a pesar de lo cual, la respuesta a un inhibidor determinado es distinta de unos frutos a otros, a veces sin que medie una diferencia de fecha esencial entre ellos. Como muestra de ello exponemos dos ensayos realizados con un intervalo de 6 días en las mismas condiciones en cuanto al material ensayado y en cuanto al método, con efectos completamente distintos:



## 1.º ensayo.—15-12-1959:

	O <sub>2</sub>	% inhib.	CO <sub>2</sub>
con cianuro	34	5	53
con DDC	27	25	40
con oxina	32	11	41
sin inhibidor	36	—	56

## 2.º ensayo.—21-12-1959:

	O <sub>2</sub>	% inhib.	CO <sub>2</sub>
con cianuro	10	80	45
con DDC	33	35	63
con N <sub>3</sub> Na	16	68	51
sin inhibidor	51	—	74

Las diferencias son múltiples y en muchos sentidos. Sin inhibidores la respiración es mayor en el segundo caso. El efecto de los inhibidores es en el segundo caso mayor que en el primero, pero, de entre ellos, el correspondiente al DDC no varía mucho, mientras que el del cianuro varía extraordinariamente, hasta el punto de que la inhibición del 5 % en el consumo de oxígeno es de las menores observadas hasta la fecha, mientras que en el segundo caso es de las mayores. En estos ensayos hemos incluido dos nuevos inhibidores: la 8-oxi-quinoleína (generalmente considerada como complejante del cobre, pero menos específica que el DDC) y la azida de sodio, que por su poca especificidad, es de esperar que tenga un efecto parecido al del cianuro; lo cual es cierto, aunque en grado menor.

Ahora consideremos un inhibidor común a los dos ensayos, por ejemplo el DDC, cuya influencia no varía mucho de un caso a otro. En el primer caso el consumo de oxígeno es de 9 microlitros menos y el desprendimiento de carbónico es de 16 microlitros menos que sin inhibidor. Ello supone en lo inhibido un cociente respiratorio de  $16/9 = 1,77$ , mientras que consideraciones análogas para el segundo caso dan para O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> respectivamente los valores de 18 y 11, lo que supone un cociente de 0,61. El significado de estos números no es muy grande porque supone exagerar el valor del uso de inhibidores, puesto que al hacer presencia el inhibidor el mecanismo respiratorio puede seguir otros derroteros, pero de todas formas sirven para comprobar que los procesos que es capaz de afectar un determinado inhibidor son completamente distintos en ambos casos.

En resumen, es forzoso admitir un estado muy dinámico en cuanto a las características de la respiración y también, aunque en menor grado, en cuanto a su magnitud. En los ensayos anteriores se ha procurado controlar el grado de madurez, el buen aspecto externo e interno del fruto,

el árbol, la zona del árbol y la hora de cogida, factores que eran iguales en los dos ensayos. Las causas que hayan influido en las diferencias observadas pueden proceder del estado del fruto en un momento determinado o de factores no controlados que varíen de un día a otro. Por ello procedemos a estudiar tres frutos A, B y C, cogidos en el mismo día y hora y manteniendo iguales los factores antes citados. Los resultados son:

	A		B		C	
	Con CNK	sin CNK	con CNK	sin CNK	con CNK	sin CNK
O <sub>2</sub> consumido	22	32	24	35	25	35

Este ensayo se realizó en diciembre de 1959. Repetido cinco meses más tarde dió

	A		B		C	
	Con CNK	sin CNK	con CNK	sin CNK	con CNK	sin CNK
O <sub>2</sub> consumido	31	46	35	51	30	47

o sea, que dentro de cada día, no hay grandes diferencias de un fruto a otro, siempre que se encuentren en las mismas condiciones. En dos fechas distintas, en cambio, la respiración es distinta y el que el porcentaje de inhibición en ambas fechas resulte parecido no debe tomarse como norma general.

Si las causas de las diferencias observadas en ensayos en distintos días no aparecen en distintos frutos ensayados en un día resulta obligado admitir en el fruto ritmos endógenos no investigados hasta ahora, aunque parece que deben ser de períodos variables.

Existen precedentes de tales ritmos; así, КРИУКОВА (49) postula en cuanto al tiempo una secuencia de oxidadas terminales con un período relativamente corto; en cebada germinando observó que, en sólo diez días pasaba de ferroenzimas a cuprienzimas y, finalmente, a flavoproteínas. Creemos conveniente aclarar aquí que la fracción de la respiración insensible al cianuro se ha venido adscribiendo, generalmente, a las flavoproteínas, pero últimamente se admite también esta posibilidad al citocromo b, que tampoco se afecta por el cianuro.

Se hace difícil el estudio de inhibición en otras zonas del fruto maduro debido a la poca intensidad de respiración, especialmente en sacos. Hemos realizado un ensayo comparativo entre flavedo y albedo en el mismo fruto con los siguientes resultados:

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
flavado sin cianuro	26	37
» con »	9	22
albedo con »	5	14
» sin »	5	14

donde se observa en el albedo que los valores de consumo de oxígeno son demasiado bajos para comparar. Los valores de CO<sub>2</sub> desprendido son ya algo considerables y en ellos no se nota influencia del inhibidor.

El problema del fruto verde se ve complicado por la posibilidad de fotosíntesis en flavado; en los sacos podría tener interés por su exaltada actividad, pero su gran acidez hace expuesto el uso del cianuro por la volatilidad del CNH y del DDC por su inestabilidad en medios de ácidos. Aún con las reservas debidas a las posibilidades de fotosíntesis ensayamos con flavado de algunos frutos jóvenes, obteniendo:

Fruto de 16 gramos:

	C <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
con CNK	34	50
sin CNK	37	79

ejemplo clásico de poca inhibición, que ya era conocido y que rara vez se da en fruto maduro con tanta intensidad.

Fruto verde plenamente desarrollado:

	C <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
con CNK	22	56
sin CNK	45	79

Aun pensando que el ensayo tenía pocas probabilidades de éxito no hemos resistido la tentación de probar el efecto del cianuro sobre sacos de frutos jóvenes y lo llevamos a cabo con uno de 19 gramos, comparando en él el flavado y los sacos:

	O <sub>2</sub>	% inhib.	CO <sub>2</sub>
flavado con CNK	32	9	26
» sin CNK	35	—	27
sacos con CNK	34	25	42
» sin CNK	45	—	44

Los valores correspondientes a la ausencia de inhibidores son los típicos del fruto joven, o sea, más respiración en sacos que en corteza y coeficientes respiratorios iguales o menores que la unidad. El peligro del uso del cianuro con los sacos podría estribar en que debido a la acidez, se volatilizara el CNH y lo midiéramos como CO<sub>2</sub> desprendido, pero en la

medida del oxígeno consumido no cabe esta posibilidad porque, en caso de desprenderse CNH sería absorbido por la pótasa presente y, en caso de no serlo, tampoco lo sería el  $\text{CO}_2$ . Contra lo que era de esperar, la inhibición en los sacos alcanza un valor muy considerable, mientras que en el flavedo la inhibición muy baja es lo normal para frutos de este tamaño.

## ALMACENAJE

En cierta ocasión determinamos actividad peroxidasa en un fruto que se había cogido del árbol 8 días antes y observamos en el flavedo una actividad que consideramos bastante superior a la normal. Ello nos indujo a tratar de estudiar las actividades enzimáticas y respiratoria a lo largo del almacenaje. Esto, de por sí, podría constituir un tema de mucha amplitud por la infinidad de variantes que pueden introducirse en las condiciones del almacenaje y en los puntos a estudiar; como puede deducirse de lo visto en esta memoria, nosotros no pretendemos en este primer trabajo realizar estudios exhaustivos, sino sólo tratar de concretar diversos problemas de la respiración del fruto, por lo que planteamos el estudio del almacenaje de una manera elemental: en un día determinado (mes de junio) cogimos suficiente cantidad de frutos y los colocamos en cajas de madera, expuestos a la atmósfera y a la temperatura ambiente (25-30°). Nuestro plan era analizarlos al cabo de períodos de tiempo variables mientras el fruto conserva su vitalidad. Tratándose de frutos maduros sólo estudiaremos de ellos el flavedo y, como los datos que vamos obteniendo son con respecto a peso total del fruto, sin tener en cuenta su contenido en agua, en los distintos días hicimos análisis de humedad, pero ésta varió entre el 80,7% en el primer día y el 74,2 % en el último día, por lo que sólo tendríamos que recurrir al peso seco en el caso de diferencias de actividad pequeñas.

Por parte nuestra existía el precedente de que frutos iguales en distintas zonas y, sobre todo, en distintos días, presentan distinta actividad, por lo que los valores de un fruto en un día determinado podrían no tener mucho significado, lo que nos indujo a usar cada día tres frutos pretendiendo deducir valores medios.

Aunque los frutos en estudio eran bastante homogéneos, se fué observando que no todos envejecían igual con el tiempo, por lo que a partir de los tres días decidimos tomar los correspondientes frutos en tres grados distintos de conservación. Cada día tomábamos el fruto mejor conservado (A), uno medianamente conservado (B) y el más envejecido (C).

De los datos obtenidos, los correspondientes a respiración resultan arbitrarios hasta donde estamos en condiciones de juzgar; la ascórbico oxidasa es difícil de estudiar comparativamente en frutos maduros por su bajo contenido en actividad. En cambio, las actividades catalasa y peroxidasa siguen, en promedio, una línea ascendente seguida de un descenso más o menos acentuado hacia el final de la vida del fruto.

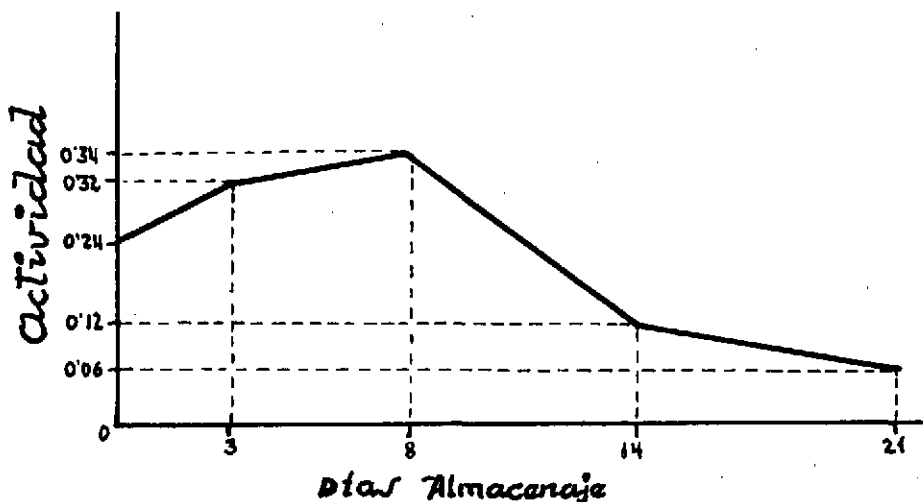
Renunciamos a exponer los datos correspondientes a la respiración porque presentan una serie de altibajos que caen lejos de nuestras posibilidades de interpretación y que requieren un estudio más detallado. Exponemos a continuación los correspondientes a actividades enzimáticas, junto con sus gráficas de actividad frente al tiempo.

En las gráficas el valor de una actividad en un día determinado es la suma de los valores de las tres muestras analizadas.

*Actividad ascórbico oxidasa:*

	A	B	C
a los 0 días	0,1	0,04	0,1
a los 3 días	0,04	0,12	0,16
a los 8 días	0,12	0,04	0,18
a los 14 días	0,07	0	0,05
a los 21 días	0,06	0	0

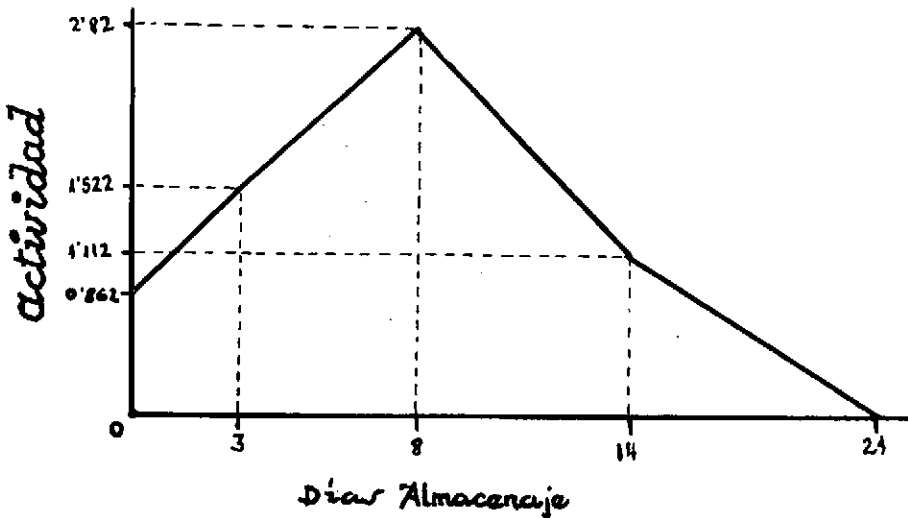
*Representación gráfica:*



ordenadas = actividad  
abscisas = días de almacenaje

*Actividad peroxidasa:*

	A	B	C
a los 0 días	0,290	0,286	0,286
a los 3 días	0,476	0,534	0,512
a los 8 días	1,152	0,820	0,848
a los 14 días	0,572	0,228	0,312
a los 21 días	0	0	0

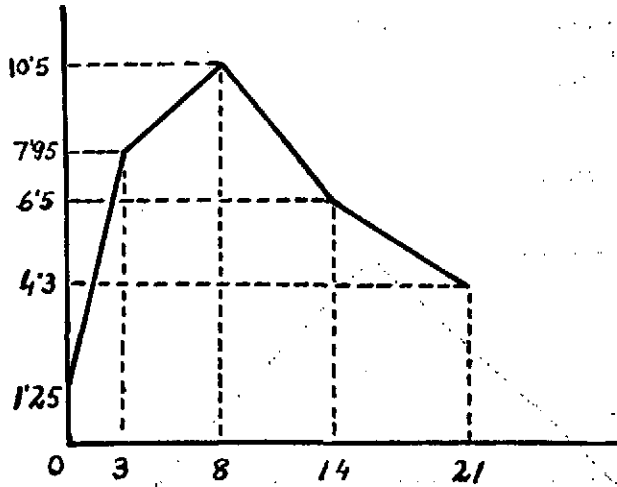
*Representación gráfica:*

ordenadas = actividad  
abscisas = días de almacenaje

*Actividad catalasa:*

	A	B	C
a los 0 días	0	0,45	0,80
a los 3 días	3,35	2,45	2,15
a los 8 días	3,15	3,20	3,70
a los 14 días	2,30	1,85	2,35
a los 21 días	1,85	1,70	0,75

Representación gráfica:



ordenadas = actividad  
abscisas = días de almacenaje





## CONCLUSIONES

1.<sup>a</sup> Se ha realizado en el limón un estudio general acerca de las actividades catalasa y peroxidasa, la capacidad para oxidar el ácido ascórbico y los intercambios respiratorios de los gases oxígeno y dióxido de carbono, tanto en las distintas zonas del fruto como en las diversas etapas de su vida. Los estudios que se habían realizado hasta ahora en este sentido y que exponemos en el capítulo de antecedentes han enfocado sólo aspectos muy limitados del problema general.

2.<sup>a</sup> Se deduce comúnmente para las actividades catalasa, peroxidasa y respiratoria una intensidad irregular en cuanto al tiempo, aun en días muy próximos entre sí, a pesar de controlarse los factores que hasta ahora se han tenido en cuenta en trabajos precedentes similares: grado de desarrollo y madurez y época del año. En cambio, en frutos cogidos al mismo tiempo se observan actividades relacionables con el período de la vida del fruto. Esto indica que dichas actividades vienen regidas por otros factores no considerados hasta ahora y se impone un estudio metódico y prolongado de las variaciones endógenas.

### SOBRE CATALASA Y PEROXIDASA

3.<sup>a</sup> Las actividades catalasa y peroxidasa, a partir de la etapa en que la zona de los sacos está bien definida (cuando el fruto pesa aproximadamente 10 gramos), se encuentran localizados, casi en su totalidad, en el flavedo.

4.<sup>a</sup> En general, ambas actividades van disminuyendo en el flavedo durante el período del crecimiento. Con respecto a esta línea general la actividad catalasa presenta la excepción de un ascenso desde los 10 a los

26,5-45 gramos; en peroxidasa, en cambio, se observa una ligera depresión que corresponde a un peso del fruto entre 17,5 y 21 gramos.

5.<sup>a</sup> Se observa una superioridad del albedo sobre los sacos en ambas actividades, pero en el caso de catalasa esto depende parcialmente de la época del año, mientras que en peroxidasa es un fenómeno general

6.<sup>a</sup> Se han hallado actividades excepcionales en sacos, superiores, incluso, a las del flavedo. Estos casos corresponden siempre a frutos de un peso ínfimo, lo que indica que en los primeros pasos del desarrollo debe tener lugar en dicha zona del fruto una gran actividad metabólica.

7.<sup>a</sup> Durante la maduración, desde el color verde hasta el amarillo intenso, no varía sensiblemente ninguna de estas actividades. En dicha etapa del fruto son frecuentes los casos de indudable, aunque pequeñísima actividad peroxidasa en sacos.

#### SOBRE ASCÓRBICO OXIDASA

8.<sup>a</sup> Existe en el limón una capacidad para oxidar el ácido ascórbico, que varía gradualmente desde un valor muy alto en frutos jóvenes hasta valores muy pequeños en frutos maduros.

9.<sup>a</sup> Durante la mayor parte de la vida del fruto la actividad en los sacos es menor que en las demás zonas; aunque la diferencia no es tan grande como en el caso de catalasa y peroxidasa. En los frutos de peso mínimo llega a ser mayor en los sacos que en las demás zonas; pero se observa un descenso muy brusco al definirse bien dicha zona (entre 10 y 15 gramos de peso total del fruto).

10.<sup>a</sup> Nunca se observa aquí la gran superioridad del flavedo sobre el albedo, como ocurre con catalasa y peroxidasa; más bien puede deducirse una ligera superioridad del albedo. En todas las zonas se observa un descenso gradual de la actividad al progresar la vida del fruto, descenso que se acentúa algo cuando el flavedo pierde su color verde.

11.<sup>a</sup> La naturaleza del enzima o los enzimas varía con bastante facilidad, a juzgar por la influencia del cianuro y del dietilditiocarbamato de sodio. Incluso en los casos en que ambos inhiben totalmente, el pH óptimo de actuación no coincide con el de las actividades ascórbico oxidasa encontradas hasta ahora en la bibliografía.

12.<sup>a</sup> La presencia de catecol nunca provoca un estímulo considerable de la actividad, por lo que no se toma en consideración la actividad polifenolasa.

## SOBRE RESPIRACIÓN

13.<sup>a</sup> En frutos adultos el flavedo es superior a las demás zonas en cuanto al consumo de oxígeno y el albedo superior a los sacos, los cuales casi no tienen capacidad para consumirlo. El dióxido de carbono desprendido también es mayor en el flavedo, pero no se observan diferencias notables entre el albedo y los sacos. El cociente respiratorio aumenta al penetrar en el interior, pero, incluso en el flavedo, es siempre superior a la unidad.

14.<sup>a</sup> En frutos desarrollados cogidos el mismo día no se observa variación de la respiración del flavedo al pasar del color verde al amarillo reciente y sí un ligero descenso en el amarillo intenso.

15.<sup>a</sup> En frutos jóvenes en las primeras etapas de desarrollo la capacidad respiratoria es extraordinariamente mayor en los sacos que en las demás zonas, tanto en el consumo de oxígeno como en el desprendimiento de dióxido de carbono, superioridad que al crecer el fruto va desapareciendo, pero no bruscamente, como lo hacen las actividades enzimáticas ensayadas (sobre todo catalasa y peroxidasa), sino de una manera gradual. Particularmente se observa un descenso mayor y definitivo cuando está acabando el desarrollo del fruto.

16.<sup>a</sup> El cociente respiratorio de los sacos al principio del desarrollo vale siempre la unidad y va aumentando al crecer el fruto. En flavedo y albedo también va aumentando, pero en las primeras etapas es siempre menor que la unidad.

17.<sup>a</sup> La presencia de iones  $\text{Cu}^{+2}$  no demuestra afectar a la respiración durante el intervalo de 30 minutos; los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  presentan, dentro de este intervalo, una inhibición progresiva, lo que se asigna a problemas de difusión en el tejido.

18. En flavedos de frutos adultos durante los primeros minutos la atmósfera de nitrógeno no influye sobre la cantidad de dióxido de carbono desprendido con respecto a medio aerobio, pero poco a poco va disminuyendo el desprendimiento y al cabo de una hora la respiración se hace muy pequeña.

Un poco antes de empezar la maduración el albedo y los sacos desprenden más  $\text{CO}_2$  en ausencia que en presencia de oxígeno y el efecto PASTEUR llega a alcanzar valores altos.

En los frutos muy jóvenes los sacos respiran extraordinariamente en el medio anaerobio, lo mismo que en el aerobio, mientras que el flavedo y el albedo casi son incapaces de respirar en el medio anaerobio.

19.<sup>a</sup> La presencia de cianuro inhibe muy poco el consumo de oxígeno por el flavedo de frutos jóvenes, pero en los sacos sí lo hace bastante.

En frutos adultos no hemos logrado observar una variación gradual de la sensibilidad al cianuro. Aun en frutos iguales en apariencia dicha sensibilidad resulta bastante variable pero, en general, es mucho mayor que en frutos jóvenes. En cambio, la inhibición por el dietilditiocarbamato sódico permanece relativamente constante.

20.<sup>a</sup> Durante el almacenaje las actividades ascórbico oxidasa, catalasa y peroxidasa incrementan para luego descender al acercarse el momento en que el fruto pierde su vitalidad.

21.<sup>a</sup> Los frutos que padecen clorosis demuestran siempre actividades catalasa y peroxidasa muy bajas, como era de esperar. Su respiración no parece diferir mucho de la del fruto normal en cuanto a intensidad, y la sensibilidad al cianuro es bastante considerable.

22.<sup>a</sup> Creemos que el presente trabajo abre camino para nuevas investigaciones que permitan penetrar más a fondo en la naturaleza íntima de los procesos biológicos y circunstancias que determinan la vida del limón.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) D. R. G. GODDARD y R. J. L. MERUSE. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1**, 207 (1950).
- (2) K. C. DIXON. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, **12**, 431-60 (1937).
- (3) B. J. D. MERUSE. Datos no publicados, cit. en *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1**, 2117 (1950).
- (4) J. MERRY y D. R. GODDARD. *Proc. Rochester Acad. Sci.*, **8**, 28-44 (1941).
- (5) W. RUDLAND y K. RAMSON. *Planta*, **28**, 471-514 (1938).
- (6) F. KIDD. *Nature*, **135**, 327 (1935).
- (7) R. ULICH. *Compt. Rend.*, **219**, 135 (1944); *La Vie des fruits*. Masson & Cie. París (1952).
- (8) L. GATET. *Ann. Physiol. Physicochim. Biol.*, **15**, 984 (1939).
- (9) K. A. KLENDENNING. *Can. J. Research*, **20**, 197 (1942); F. G. GUSTAFSON. *Plant Physiol.* **4**, 349 (1929); R. ULICH. *Bull. Soc. Botan. France*, **94**, 387 (1947).
- (10) F. G. GUSTAFSON, I. CLARK, D. A. SAHJ y E. WARBERG. *Plant Physiol.* **7**, 155 (1932).
- (11) L. TOMBESI, A. BAHOCCHIO, T. CERVIGNI, S. FORTINI, M. TARANTOLA y M. E. VENEZIAN. *Ann. Speri. Agrar.* **6**, 857 (1952).
- (12) H. S. MASON. *Advances in Enzymology*, **19**, 105 (1957).
- (13) K. AGNER. *Nature*, **159**, 271 (1947); *J. Exptl. Med.*, **92**, 337 (1950); O. M. HELMER y K. G. KOHLSTADT. *Science*, **102**, 422 (1945); P. F. WAGLEY, I. W. SIZER, L. K. DIAMOND y F. H. ALLEN. *J. Immunol.*, **64**, 85 (1950); L. W. SIZER, C. O. BRINDLEY y P. E. WAGLEY. Primer Congreso Internacional de Bioquímica. Resumen de las Comunicaciones (1949), p. 361.
- (14) D. C. DAVISON. *Proc. Linnæan Soc. N. S. Wales*, **74**, 26-36 (1949).
- (15) F. M. V. HACKAY. *Proc. Linnæan Soc. N. S. Wales*, **73**, 439-54. 4 455-65 (1948).
- (16) L. W. MAPSON. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 132 (1958).
- (17) W. D. BONNER, Jr. *Ann. Rev. Plant.*, **8**, 427-52 (1957).
- (18) J. B. BIALB y R. E. YOUNG y ALICE J. ALMSTEAD. *Am. J. Botany*, **34**, 30-9 (1947).
- (19) J. B. BIALB. *Calif. Citrograph*, **38**, 427, 436-8 (1953).
- (20) J. B. BIALB, R. E. YOUNG y ALICE J. ALMSTEAD. *Plant Physiol.* **29**, 168-74 (1954).
- (21) YU. Y. RAKITIN. *Biokhimiya*, **10**, 373-8 (1945).
- (22) B. A. RUBIN, E. V. ARTSIKHOVSKAYA y T. M. IVANOVA. *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, **60**.
- (23) E. V. ARTSIKHOVSKAYA y B. A. RUBIN. *Doklady Akad. Nauk. SSR*, **64**, 215-17 (1949).
- (24) B. A. RUBIN, E. V. ARTSIKHOVSKAYA y T. M. IVANOVA. *Doklady Akad. Nauk. SSR*, **72**, 89-92 (1950).
- (25) E. M. HARVEY. *U. S. Dept. Agr. Tech. Bull.*, 908 (1946).
- (26) B. A. RUBIN, E. V. ARTSIKHOVSKAYA y T. M. IVANOVA. *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, **60**, 427-7 (1948).
- (27) B. A. RUBIN, E. V. ARTSIKHOVSKAYA y T. M. IVANOVA. *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, **72**, 89-92 (1950).
- (28) M. H. HALLER, DEAN H. ROSE, J. M. LUTZ y PAUL L. HARDING. *J. Agr. Research*, **71**, 327-59 (1945).
- (29) LEÓN G. GONZÁLEZ. *Proc. Atl. Soc. Hort. Sci.*, **51**, 132-6 (1948).

- (30) L. ARMENTANO y HELENE A. BARTOK. *Biochem. Z.*, **311**, 418-25 (1942).
- (31) R. STROECKNER, A. BUSSE SUNDERMANN y E. BUCHHOLZ. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **82**, 113-21 (1941), en *Chem. Zentr.*, **11**, 2884 (1941).
- (32) J. C. SOMOGYI. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **2**, 269-74 (1944).
- (33) T. VALE. *An. Sper. Agrar (Roma)*, **5**, 221-6 (1951).
- (34) ANNA MILLNER EIBERT (Rusia), en *Ch. A.* 15718, b, (1957).
- (35) S. P. L. SÖRENSEN. *Biochem. Z.* **21**, 131 (1909); **22**, 352 (1909).
- (36) S. P. L. SÖRENSEN. *Biochem. Z.* **21**, 131 (1909); **22**, 352 (1909).
- (37) T. C. McILVAINE. *J. Biol. Chem.*, **49**, 183 (1921).
- (38) CHARLES R. DAWSON y RICHARD J. MAGUE. *Methods in Enzymology*, **11**, 835 (1955).
- (39) LUCILE SMITH. *Methods in Enzymology*, **11**, 735 (1955).
- (40) J. K. SCOTT. *Respiration in bulky plant tissue* (Tesis), 1-150 (1949).
- (41) W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS y J. F. STAUFFER. *Manometric Techniques*, Burgess Publishing Co. Tercera edición, segunda impresión (1959).
- (42) *Manometric Techniques*.
- (43) *Manometric Techniques*.
- (44) C. GERBER. *Recherches sur la maturation des fruits charnus*. (Tesis), Paris (1897).
- (45) *Manometric Techniques*.
- (46) J. B. BIALK y R. E. YOUNG. *Am. J. Botany*, **34**, 301-9 (1947).
- (47) J. BERGER, P. SMITH y G. S. AVERY JR. *Am. J. Botany*, **33**, 601-4 (1946); J. BONNER. *Am. J. Botany*, **36**, 429-36 (1949).
- (48) F. E. DENNY. *Contribs. Boyce Thompson Inst.*, **14**, 257-76 (1946); **14**, 383-96 (1947); **15**, 141-51 (1948).
- (49) N. KRIUKOVA. *Biokimiya*, **14**, 538 (1949).