



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

**TECNICAS COLORIMETRICAS RAPIDAS Y SENCILLAS PARA
LA DETECCION DE MAGULLADURAS EN FRUTOS DE
PERAS Y MANZANAS**

L. RODRIGUEZ SINOBAS, M. RUIZ ALTISENT

Investigación Agraria
Producción y Protección Vegetales

Vol. 7 (1) - 1992

Separata núm. 8

TECNICAS COLORIMETRICAS RAPIDAS Y SENCILLAS PARA LA DETECCION DE MAGULLADURAS EN FRUTOS DE PERA Y MANZANA

L. RODRIGUEZ SINOBAS

M. RUIZ ALTISENT

Dpto. de Ingeniería Rural. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid
Ciudad Universitaria, 28040 Madrid

RESUMEN

Se han desarrollado una serie de técnicas colorimétricas sencillas, rápidas y eficaces para la detección de magulladuras en frutos de manzana cvs. «Golden Delicious» y «Starking» y de pera cv. «Blanquilla» y «Decana de Comice». Dichas técnicas están basadas, por una parte, en la reacción coloreada que se produce entre el grupo de enzimas polifenoloxidasas con soluciones que contienen como sustratos característicos catequina y epinefrina y, por otra, en el empleo del reactivo safranina.

Los resultados obtenidos demuestran que el tipo de técnicas descrito podría resultar de gran utilidad en la detección no sólo de las magulladuras producidas por diversas cargas mecánicas durante el proceso de recolección y envasado en frutos de pepita como los aquí ensayados, sino también en el estudio específico del tipo de magulladura producido. Se sugiere, que las técnicas podrían hacerse extensivas a otros tipos de frutos.

PALABRAS CLAVE: Cargas mecánicas en frutos
Detección magulladuras
Manzana
Pera

INTRODUCCION

La magulladura de los frutos, según la definición dada por Mohsenin (1972), es el daño producido en sus tejidos por fuerzas exteriores causantes de una variación física de la textura, que lleva acompañado alteraciones químicas del color y sabor. Una gran parte de las magulladuras producidas por cargas mecánicas (Mohsenin 1972, Dal Fabro *et al.*, 1980), son ocasionadas por fenómenos de compresión (contra otros frutos, paredes de cajas, suelo), e impacto (de un fruto contra otro, contra superficies rígidas).

Para la evaluación de las magulladuras es necesario caracterizar el ablandamiento y cambio de color producido en los tejidos coloreados (Chen *et al.*, 1986; Holt y Schoorl, 1980; Rodríguez, Ruiz, 1988; Ruiz, García, 1988). El ablandamiento es debido a la degradación de la pared celular y de la lámina media, ocasionado por la acción de enzimas del grupo poligalacturonasas, polimetilesterasas y celulasas. El cambio de color producido por magulladura es debido, fundamentalmente, a pardeamiento, resultado de la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos llevada a cabo por el grupo de enzimas polifenoloxidasas (PPO) y pero-

Recibido: 4-3-91.

Aceptado para su publicación: 13-1-92.

Redactor asociado: J. L. García Martínez.

xidasas (PO). Los fenoles se transforman en quinonas, que son inestables y se polimerizan en compuestos melánicos de alto peso molecular, de color generalmente pardo (Coombe, 1976). La intensidad de la reacción de coloración depende de factores como: la concentración de fenoles, la actividad de las enzimas PPO, el pH del fruto, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el tiempo transcurrido tras lesionar el tejido (Kader, 1980).

Durante los últimos años Kader *et al.*, (1982) han utilizado diversos métodos colorimétricos para la evaluación de la magulladura y la estimación de la susceptibilidad al pardeamiento de distintas variedades de melocotón. Estos autores elaboraron una serie de cartas colorimétricas, con solución de catecol, con las que caracterizaron el potencial de pardeamiento de los frutos ensayados. La epinefrina, otro sustrato típico del grupo de enzimas polifenoloxidasas, ha sido ensayada por Obeso (1981) para la detección de la enzima PPO en garbanzo.

El reactivo safranina tiñe específicamente, entre otros componentes celulares, paredes lignificadas, suberificadas y núcleos a los que dota de un color rojo brillante (Martínez *et al.*, 1979).

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de una serie de técnicas colorimétricas utilizando soluciones acuosas de catecol, epinefrina y safranina, para evaluar y estudiar las magulladuras producidas por cargas mecánicas en frutos. Estas técnicas podrían posteriormente, ser empleadas en los ensayos que se llevan a cabo en el control de calidad de los frutos.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron frutos de manzana cvs. «Golden Delicious» y «Starking», y de pera cvs. «Blanquilla» y «Decana de Comice». Los frutos se mantuvieron durante un mes en cámaras de conservación a $0 \pm 0,5^{\circ}$ C (manzanas) y a $1 \pm 0,5^{\circ}$ C (peras), con humedad relativa del 85 p. 100. Los frutos fueron atemperados durante tres horas a temperatura ambiente antes de su utilización.

Observación microscópica

La evaluación del tejido magullado (coloración, forma, planos de rotura, etc.), se llevó a cabo visualmente y con una lupa binocular Nikon (1-63 X), en la que se instaló un equipo microfotográfico Nikon PFM con caja M35S y que además poseía luz transmitida por fibras ópticas.

Tratamiento

Se utilizó un total de 12 frutos por ensayo, tanto en manzana como en pera, seis de los cuales servían como lote de referencia y el resto se dañaba mecánicamente. El daño mecánico consistió en compresiones e impactos realizados indistintamente alrededor de la zona ecuatorial del fruto. El número total de compresiones e impactos practicados por fruto ensayado fue seis por término medio.

Los impactos se realizaron con un indentador esférico metálico de 0,94 cm de radio de curvatura y 50,6 g de peso. El indentador se impregnó con tinta para delimitar la zona de contacto con el fruto donde se producía la magulladura. Los impactos se efectuaron en un rango comprendido entre los 2 y 10 cm de altura.

La compresión se realizó en una Máquina Universal de Ensayos Instron (mo-

delo 1122), con el mismo indentador del impacto y con un rango de deformaciones de 1 y 3 mm.

Procedimientos de tinción

Reactivo catecol

Anteriormente Kader *et al.*, (1987) utilizaron soluciones de catecol con tampón fosfato. La solución de catecol ensayada (0,2 M), sin embargo, no incluye el tampón, ya que previamente se observó que no afectaba a la coloración producida en los frutos por el reactivo.

Los protocolos seguidos se detallan a continuación:

Técnica 1: Tras producirse el daño mecánico se esperaron 15 min a que la reacción de magulladura se completara. Seguidamente se realizó un corte longitudinal en la parte central de la misma y se añadió, a cada una de las mitades, una gota de la solución de catecol. Se esperó 6 min antes de proceder a comparar la intensidad de coloración adquirida.

Técnica 2: La epidermis se perforó con alfileres entomológicos y a continuación se depositó sobre la zona perforada, durante una hora, un algodón embebido con la solución de catecol, sujetándolo al fruto con cinta de celofán. A continuación, con una cuchilla, se realizaron cortes longitudinales de secciones de 1 mm de espesor aproximadamente, partiendo desde el centro de la magulladura al interior de la misma.

Técnica 3: Los frutos fueron sumergidos en cloroformo durante 30 s para disolver los ácidos grasos de la cutícula, se secaron con papel absorbente y seguidamente se introdujeron en la solución de catecol por espacio de 6, 8, 10 y 15 min respectivamente. A continuación, se secaron y se esperó entre 6 y 10 min antes de efectuar un corte transversal de 1 mm en su zona ecuatorial, con una cortadora automática modelo Krups Typ 357, que sirvió para la evaluación del daño producido.

Técnica 4: Secciones transversales de unos 3 cm de grosor se sumergieron en solución de catecol durante 2 min. A continuación se secaron con papel de filtro, se esperaron 6 min y se eliminó, con la cortadora automática, una sección superficial de 1 mm de grosor antes de evaluar la magulladura.

Técnica 5: Es una combinación de las técnicas 3 y 4, que consta de los siguientes pasos:

1. El fruto se sumerge en cloroformo durante 10 s, se seca y se procede a observar las manchas superficiales.
2. Se cortan secciones transversales del fruto de 20 a 30 mm de grosor y se sumergen en solución de catecol durante 2 min. Se espera el oscurecimiento de la superficie (aproximadamente unos 6-10 min).
3. Se elimina una sección de 1 mm de espesor en cada sección inicial y se procede a la evaluación de las magulladuras.

Reactivo epinefrina

Se utilizó la solución empleada por Obeso (1981), pero sin extracto enzimático, dado que económicamente resultaba costoso y no mostró tener una mayor eficacia en la observación y evaluación de la nitidez de la magulladura. Los protocolos utilizados con este reactivo fueron los mismos que los recogidos en las técnicas 1 y 2 descritas para la solución de catecol.

Reactivo safranina

Tras dañar los frutos, a las 2 horas se procedió al corte longitudinal de la magulladura por su parte central, en secciones de un espesor aproximado de 0,5 y 1 mm. Las secciones se tiñeron con solución acuosa de safranina al 0,1 p. 100 durante 5 min, se lavó el exceso de colorante y se secaron en papel de filtro. Las secciones colocadas sobre un portaobjetos fueron observadas con lupa utilizando luz transmitida.

RESULTADOS Y DISCUSION**Solución de catecol**

La técnica 1 permitió comparar las distintas tonalidades de coloración de las magulladuras, que dependieron del estado y de la actividad PPO en el tejido una vez efectuada la lesión mecánica. El tamaño de la magulladura aumentó con la energía aplicada al fruto. La reacción de coloración se produjo en la totalidad del volumen de tejido magullado, por lo que al seccionar (en 1 mm) la superficie, la magulladura pudo observarse nítidamente (Fig. 1). La magulladura presentó con frecuencia una parte central de coloración más intensa que coincidió con la zona donde se producen las tensiones máximas (el tejido sufre una alteración mayor).



Fig. 1.—Observación de la magulladura en secciones longitudinales de 0,5 cm de grosor de pera cv. «Decana de Comice» teñida con solución de catecol (técnica 1). 15 X.

F: plano de fractura; **H:** hipodermis; **M:** magulladura; **T:** tejido referencia.

Bruise on a longitudinal section (0.5 cm thick) of «Decana de Comice» pear produced by mechanical injury and stained with catechol solution (technique 1). 15 X.

F: fracture plane; H: hypodermis; M: bruise area; T: reference tissue.

Por debajo de esta zona la coloración es menos intensa, llegando a anularse cuando entra en contacto con el tejido no magullado.

La técnica 2 permitió apreciar con nitidez la forma de la magulladura, delimitando perfectamente el área dañada. La serie de cortes realizados desde su parte media hacia el interior, con un espesor aproximado de 1 mm, sirvió para seguir la evolución de la magulladura en profundidad. Esta técnica es difícil de realizar, ya que es necesario perforar la epidermis sin dañar la pulpa del fruto. No se encontró, sin embargo, una técnica más apropiada para la perforación de la epidermis sin dañar el resto de los tejidos.

En la técnica 3 se detectó todo tipo de magulladuras, tanto naturales (contenidas en el fruto antes de la lesión mecánica) como realizadas mecánicamente con el indentador, y posibilitó la observación nítida de sus contornos. La comparación de tiempos de ensayo permitió comprobar que en 8 min se completaba la reacción de magulladura, apreciando perfectamente la intensidad del color. Los frutos tratados con cloroformo presentaron decoloración superficial, no existiendo apenas diferencias en la visualización del interior del tejido entre frutos tratados y no tratados. Esto puede ser debido a que el tiempo de inmersión en cloroformo no fue el adecuado para disolver la mayoría de los ácidos grasos de la cutícula del fruto. Ensayos realizados con tiempos de inmersión mayores mostraron alteraciones de la

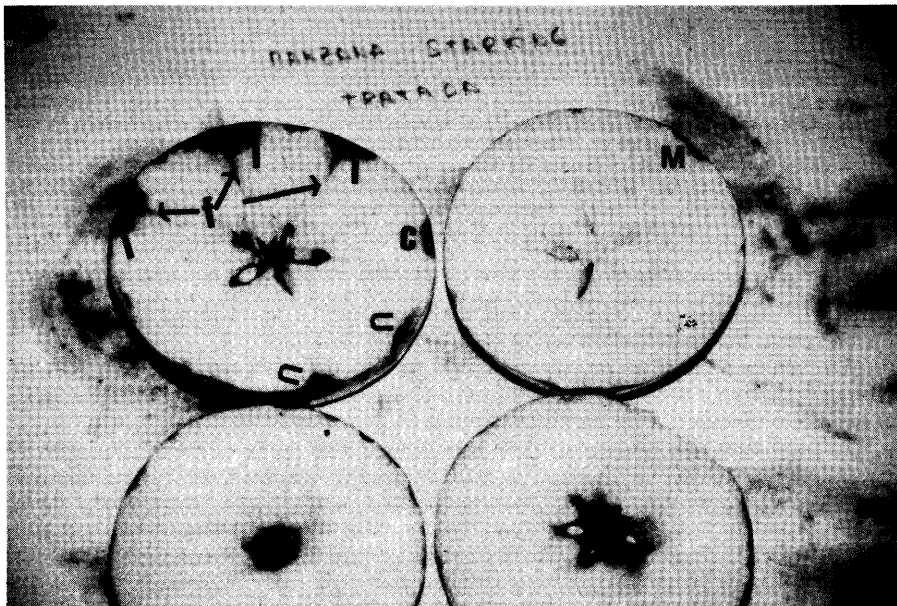


Fig. 2.—Evaluación de múltiples magulladuras en secciones transversales de 3 cm de grosor en manzana cv. «Starking» teñida con solución de catecol (técnica 5).

C: magulladura producida por compresión mecánica; F: plano de fracturas; I: magulladura producida por impacto mecánico; M: magulladura ocurrida de forma natural en el fruto.

Evaluation of multiple bruises on «Starking» apple transversal sections (3 cm thick), stained with catechol solution (technique 5).

C: bruises produced by compression; F: fracture plane; I: bruises produced by mechanical impact, M: bruises included in the fruit.

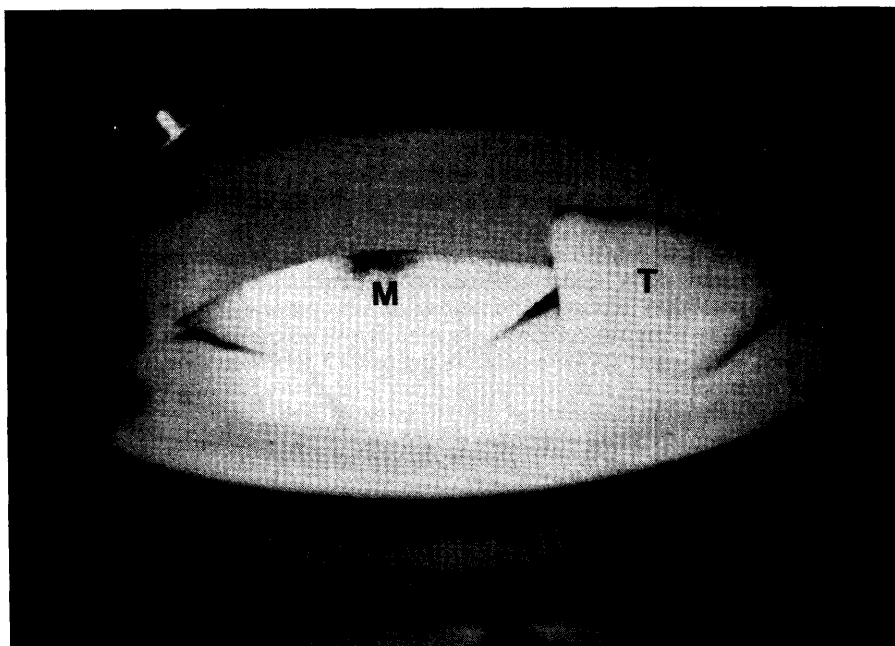


Fig. 3.—Observación por medio de luz transmitida por fibras ópticas, de la magulladura en secciones de pera cv. «Blanquilla» teñida con solución de epinefrina.

M: magulladura producida por compresión; T: tejido de referencia.

Bruise on «Blanquilla» pear sections stained with epinephrine solution, and observed by transmitted light using optical fibers.

M: bruise produced by compression; T: reference tissue.

pulpa. En manzana cv. «Golden Delicious», sin embargo, la inmersión en cloroformo reveló las magulladuras en la parte externa del fruto.

La técnica 4 permitió acortar el tiempo de inmersión necesario para la penetración del reactivo a través de la epidermis y resto de tejidos, mejorándose, por tanto, el resultado obtenido. Ello permitió eliminar el pretratamiento con cloroformo.

El protocolo más eficaz fue el de la técnica 5, que permitió observar, tanto las magulladuras superficiales como las internas. En la evaluación de las magulladuras internas (Fig. 2) se observó con bastante nitidez el contorno de las mismas y de las grietas producidas. El tamaño de magulladura aumentó con la carga mecánica aplicada y la forma de las magulladuras permitió precisar qué tipo de daño mecánico había sufrido el fruto. Esta técnica es susceptible de automatización, con lo que aparece como un posible procedimiento de muestreo de calidad en partidas de frutos frescos. Para ello se requiere continuar con su desarrollo y tratar de hacerlo extensivo a otros tipos de frutos.

Los resultados obtenidos en este trabajo en pera y en manzana, y los obtenidos por otros autores (Kader *et al.*, 1982) en melocotón, muestran la aplicación directa de soluciones de catecol en la evaluación de magulladuras. Esta solución podría servir para mostrar de forma rápida y sencilla la susceptibilidad al pardeamiento enzimático de distintas especies de frutos, tales como los de pepita y hueso, y

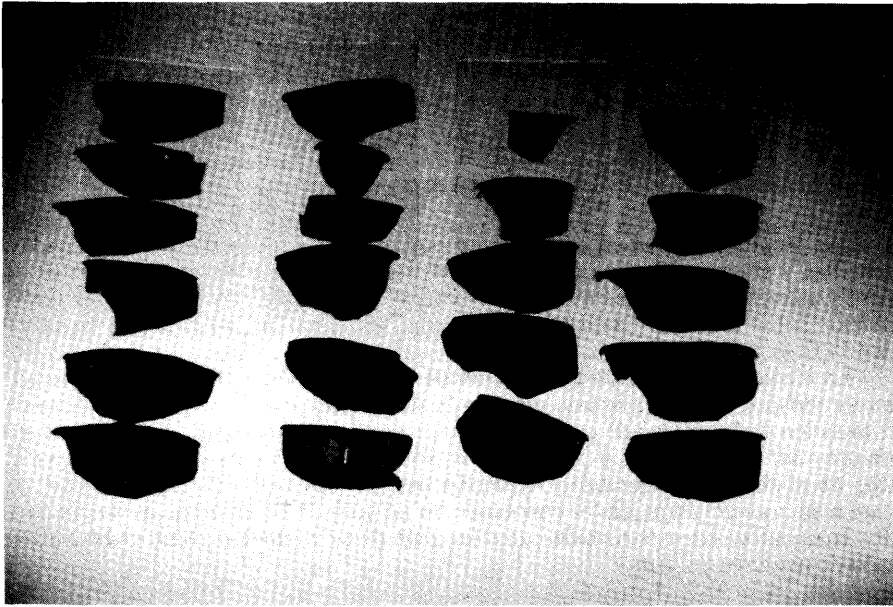


Fig. 4.—Observación de magulladuras en secciones de manzana cv. «Golden Delicious», aproximadamente de 1 mm de espesor, producidas por la aplicación de cargas mecánicas diferentes y tenidas con solución de safranina.

T: tejido de referencia.

Bruise on «Golden Delicious» apple sections (1 mm thick) produced by mechanical injury, and stained with safranin solution.

T: reference tissue.

cómo ésta varía con el grado de madurez. El empleo de la solución de catecol también podría ser útil en la realización de cartas colorimétricas que mostrasen la susceptibilidad al pardeamiento enzimático de distintas especies de frutos.

Solución de epinefrina

Este reactivo fue eficaz en la observación de las magulladuras en pera. La tonalidad rojiza delimitó perfectamente el contorno de la magulladura y permitió observar claramente la forma de la misma, tanto en las secciones centrales como en las interiores (Fig. 3).

Esta solución, sin embargo, no dio buenos resultados en las variedades de manzana ensayadas. Creemos que esto puede deberse a que en manzana existe una menor concentración de enzima(s) del grupo PPO que utiliza sustrato epinefrina.

Se aconseja la utilización de este reactivo en pera, pero no así en manzana.

Reactivo safranina

La solución de safranina empleada sirvió para detectar la zona dañada y para poder apreciar diferencias en la forma y tamaño de las células, paredes rotas, pre-

sencia de fracturas y discontinuidades en los tejidos afectados (Fig. 4). Con el protocolo seguido fue posible la comparación de los diferentes tipos de magulladuras obtenidos por la aplicación de cargas diferentes a la hora de producir el daño mecánico de los frutos.

CONCLUSIONES

Las técnicas citadas en este artículo presentan la ventaja de que son rápidas, sencillas y eficaces para la detección de las magulladuras observadas en frutos de pera y manzana sometidas a diferentes cargas mecánicas. Aportan además información sobre la forma y tamaño de la misma, así como las zonas donde la actividad PPO es más intensa.

La técnica de inmersión en solución de catecol 0,2 M en dos fases, frutos entero y rodajas, abre además una vía para la automatización de un procedimiento de evaluación de la calidad de partidas de frutos de peras y manzanas. Esta técnica sería muy útil en almacenes y comercios, no sólo por su sencillez sino también por el tipo de material de laboratorio requerido para su desarrollo. Sería ventajoso, de cara a su comercialización, el conocimiento no sólo de las diferencias de contenidos enzimáticos entre variedades, sino también de su evolución según avanza el estado de madurez del fruto.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto del Frío (C.S.I.C.) en el cual se ha realizado el proceso de conservación de los frutos. Al Comité Conjunto Hispano-Norteamericano, el cual ha financiado el Proyecto. A Frutas Niqui de Alpicat (Lérida).

SUMMARY

Simple and fast colorimetric techniques for bruise detection in pear and apple fruits

Several simple and fast colorimetric techniques were developed for bruise detection in pomme fruits. They are based on colored reactions produced between the polyphenoloxidase enzymes with solutions containing their specific substrates i.e. catechine and epinefrine. Apples and pears were used, but the techniques described are also appropriate for other types of fruits.

KEY WORDS: Apple
Bruise detection
Colorimetric techniques
Mechanical loads
Pear

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- COOMBE B. G., 1976. The development of fleshy fruits. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27: 507-28.
CHEN P., RUIZ M., LU F., KADER A., 1986. Study of impact and compression damage on Asian pears. ASAE Paper no. 86-3025.
DAL FABRO J. M., MURASE H., SEGERLIND L. J., 1980. Strain failure of apple, pear and potato tissue. ASAE paper no. 80-3048.

- KADER A. A., 1980. Brown discoloration of Clingstone peaches. *Cling Peach Quaterly*. 16 (1): 12-13.
- KADER A. A., ULRICH G., HEINTZ C., CHORDAS A., 1982. Factors influencing bruising of Clingstone peaches and evaluation of methods for detecting bruising progress. Report february 1982. Dpt. of Pomology, University of California, Davis.
- HOLT J. E., SCHOORL D., 1980. Bruise resistance measurements in apples. *J. of Texture Studies*, 11: 389-394.
- MARTINEZ M., AYERBE L., FERNANDEZ J., 1979. Técnicas de histología vegetal. Monografía no. 4. E.T.S.I. Agrónomos, Madrid.
- MOHSEIN N. N., 1972. Mechanical properties of fruits and vegetables, review of a decade of research. Application and future needs. *Trans. Ame. Soc. Agr. Eng.* 15, 1064.
- RODRIGUEZ L., RUIZ M., 1988. Modelo lineal para la predicción del daño producido por impacto mecánico en la pera cv «Blanquilla». *Actas III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (S.E.C.H.)*. Las Palmas, Octubre 1988.
- RUIZ M., GARCIA C., 1988. Impacto mecánico en frutos: determinación de la textura y de la resistencia de la magulladura en variedades de pera y manzana. *Actas del III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (S.E.C.H.)*. Las Palmas, Octubre 1988.
- OBESO J. R., 1981. Evolución de la actividad polifenoloxidasas durante la germinación de *Cicer arietinum*, L. Memoria de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad de Oviedo.