

Estudio del efecto de una atmósfera ozonificada sobre la actividad peroxidásica y algunas propiedades físicas en las hojas de rábano (*Raphanus sativus*)

María José Scholis, Patricio Castillo y Florinella Muñoz
Laboratorio de Química Orgánica e Investigaciones Aplicadas
Departamento de Ciencias Nucleares
florinella.munoz@epn.edu.ec

Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto del ozono sobre algunas características físicas y bioquímicas de las hojas de rábano (*Raphanus sativus*). Se realizaron pruebas preliminares, para estudiar la reacción entre H_2O_2 (2.0 mol/L) y guayacol (0.1 mol/L), con extractos de hojas de aguacate (*Lauraceae persea*), higo (*Moraceae ficus*), geranio (*Geraniaceae pelargonium*) y rábano (*Raphanus sativus*) con y sin tratamiento con ozono y se hicieron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro para determinar la actividad peroxidásica. Se escogió al rábano para la realización de las pruebas posteriores.

Las plantas de rábano fueron sometidas a 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 ppm de ozono durante 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 horas. Se determinó la actividad peroxidásica de las hojas de rábano y se observó que no varía entre 0.04 y 0.06 ppm de ozono, mientras que, entre 0.08 y 0.10 ppm, la actividad peroxidásica aumenta. A las mismas condiciones se hicieron determinaciones de porcentajes de humedad, antes y después de las ozonificaciones. Los resultados mostraron que se pierde mayor humedad entre las dosis de 0.04 y 0.10 ppm de ozono con el tiempo de exposición. El color y la consistencia fueron determinados al observar las hojas de rábano, antes y después de las ozonificaciones, a cada dosis y tiempos de exposición. Se observó una disminución de estas características respecto al tiempo, con base en una escala creada.

Palabras claves: actividad peroxidásica, ozono, estrés oxidativo, hojas de rábano, humedad.

Abstract

In the present work, it was studied the ozone effect on some physical and biochemical characteristics of horse radish (*Raphanus sativus*) leaves. Pre-tests were carried out, through the reaction among H_2O_2 (2.0 mol/L) and guaiacol (0.1 mol/L), with extracts of avocado (*Lauraceae persea*), fig (*Moraceae ficus*), geranium (*Geraniaceae pelargonium*) and horse radish (*Raphanus sativus*) leaves with and without treatment with ozone and readings of absorbance were made in a spectrophotometer to determine the peroxidase activity. Horse radish was chosen to continue the study.

Horse radish plants were exposed to ozone doses of 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 ppm during 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0 hours. Peroxidase activity was determined in leaves and it was established that between 0.04 and 0.06 ppm of ozone, this parameter was the same between 0.08 and 0.10 ppm it increases. At the same conditions were measured the moisture percentage before and after the ozonification. Horse radish leaves lost more humidity between 0.04 and 0.10 ppm of ozone with the time of exposition.

color and consistency were determined by visualizing leaves before and after ozonification at each concentration and times. A decrease of these characteristics was observed regarding the time, based on an own scale.

Keywords: peroxidase activity, ozone, oxidative stress, horse radish leaves, moisture.

1 Introducción

El ozono en la estratósfera forma una capa situada entre los 10 y los 35 km de altura medidos desde la superficie terrestre, la misma que protege a la Tierra de la incidencia de los rayos UV, al absorber gran parte de es-

ta radiación. No obstante, cuando el ozono se encuentra en la tropósfera es uno de los contaminantes atmosféricos más perjudiciales. El ozono troposférico se forma por medio de reacciones fotoquímicas que involucran a

los NO_x y VOCs, en presencia de la luz solar [4].

El ozono en la tropósfera genera una disminución de la calidad del aire y causa daños sobre los seres vivos. En humanos y animales produce irritación de las mucosas del aparato respiratorio y los ojos, cambios en el funcionamiento de los pulmones y envejecimiento de la piel. En las plantas, el ozono troposférico produce cambios en la coloración de las hojas, que pasan de verde a pardo, amarillo o blanco; además, reduce la fotosíntesis, el número y el crecimiento de las hojas, reduce y altera los carbohidratos almacenados en la planta, hace defectuoso el crecimiento del tallo, reduce el crecimiento de hongos beneficiosos para la planta, etc. Los daños producidos por el ozono troposférico son causados por reacciones entre el ozono y los compuestos que se encuentran en las estructuras de los tejidos de los diferentes organismos. Estas reacciones originan la formación de especies reactivas pro-oxidantes, que son las responsables del estrés oxidativo en tales organismos [3].

Todos los seres vivos tienen en su estructura celular compuestos que les sirven para activar mecanismos de defensa contra los daños que produce el estrés oxidativo. Entre estos compuestos se encuentran algunas enzimas, que pueden tener distintas funciones específicas, tales como las peroxidases que, en general, son hemoproteínas, que catalizan reacciones de eliminación de los pro-oxidantes y remedian los tejidos afectados por el estrés oxidativo [6].

Las peroxidases catalizan reacciones bisustrato de tipo redox. Uno de los sustratos es generalmente el H₂O₂ y el otro es un reductor orgánico, que es oxidado por el peróxido [1, 5].

Mediante la determinación de la actividad peroxidásica se puede conocer el comportamiento de la planta al ser expuesta a ciertas dosis de ozono y establecer la existencia de una relación que permita el uso de esta planta como un bioindicador.

En esta investigación se buscó determinar el efecto de la presencia de ozono en el aire ambiente en contacto con hojas de rábano (*Raphanus sativus*), para establecer si se existen tendencias de variación de la actividad peroxidásica con la cantidad de ozono ambiental.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para los ensayos preliminares de la actividad peroxidásica se utilizaron extractos de hojas de geranio (*Geraniaceae pelargonium*), aguacate (*Lauraceae persea*), higo (*Moraceae ficus*) y rábano (*Raphanus sativus*). Los reactivos utilizados: Guayacol (Merck), K₂HPO₄ (Baker) y TRIS-HCl (Fisher) fueron de grado analítico. Se usó H₂O₂ (Baker) al 30%.

Se prepararon las siguientes soluciones K₂HPO₄, 0.1 mol/L; TRIS-HCl, 0.01 mol/L (pH = 7); guayacol, 0.1 mol/L; H₂O₂, 2.00 mol/L.

En las pruebas preliminares de selección del vegetal, se utilizó un ozonificador Philaqua, modelo BMT 802M, con tanque de oxígeno. Para el acondicionamiento de los vegetales se utilizaron gavetas de plástico de 22 cm × 60 cm × 45 cm, e invernaderos de madera con tapa de vidrio de 60 cm de altura máxima y 17 cm de altura mínima y base de 100 cm × 60 cm. Para el análisis del efecto de la atmósfera ozonificada se utilizó un ozonificador Sanitron con sensor de ozono. En las determinaciones de actividad peroxidásica se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu, modelo UV-240, una balanza analítica Acculab, una estufa Cenco, una centrífuga Damon de 4000 rpm (2146.5 g).

2.2 Métodos

2.2.1 Ensayos para determinar la actividad peroxidásica en vegetales

Se recolectaron las hojas de los vegetales en análisis, 10 horas antes de la preparación del extracto. Las hojas fueron previamente lavadas, cortadas, pesadas y maceradas en un mortero con la solución 0.1 mol/L de K₂HPO₄ en un volumen igual al peso de las hojas cortadas. El extracto fue refrigerado por 24 h. Se filtró el preparado y se extrajo la parte líquida, que fue centrifugada a 3500 rpm (1650g) durante 30 min a temperatura ambiente. El extracto líquido fue almacenado y refrigerado por 24 h. En una celda de cuarzo se mezclaron 1.6 mL de TRIS-HCl, 1.2 mL de guayacol y 0.1 mL de H₂O₂ 2.0 mol/L con 0.16 mL de extracto (de cada tipo de hoja), a temperatura ambiente y se hicieron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS cada 15 s, durante 3 min, a 470 nm. Para los blancos se utilizaron las mismas cantidades descritas, excepto el extracto, que se cambió por agua destilada. Se calculó la diferencia de absorbancias entre cada muestra y el respectivo blanco (ΔDO_{470}). La actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de los vegetales se obtuvo mediante la pendiente de los gráficos de $\Delta DO_{470} \setminus \Delta t$, a través de la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{\Delta DO_{470}}{\Delta t} \frac{1}{k} \frac{1}{d} \frac{1}{V_e} V_c \text{ dil},$$

donde:

AE: actividad enzimática, expresada en $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$

ΔDO_{470} : diferencia de densidades ópticas entre la muestra y el blanco, medidas a 470 nm

Δt : intervalo de tiempo de reacción en min

V_e : volumen de extracto = 0.16 mL

V_c : volumen total de la mezcla = 3.06 mL

k : coeficiente de extinción del guayacol oxidado = $5.570 \times 10^{-6} \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d : espesor de la cubeta = 1 cm

dil: factor de dilución

2.2.2 Tratamiento de las hojas de los vegetales con ozono

Se colocaron las hojas lavadas, cortadas y pesadas en un frasco de vidrio de 2 L. Se añadieron 50 mL de agua destilada. Se colocó un sistema de burbujeo de ozono en la boca del recipiente de vidrio, que a su vez fue introducido en una sorbona. Se hizo burbujear ozono durante 30 s, a 0.5 bar y 0.8 L/min para una producción de ozono de 2.8 g/h (Noroña, 2002).

Se obtuvieron los respectivos extractos y se hicieron las lecturas de absorbancia para determinar la actividad peroxidásica. Con estos datos, se seleccionó el vegetal que presentaba los mejores resultados.

2.2.3 Determinación del efecto del tiempo transcurrido entre el corte y el análisis sobre la actividad peroxidásica de las hojas del vegetal seleccionado

Para establecer la reproducibilidad de los resultados y aislar algunas fuentes de variación de los mismos, se hizo una prueba para establecer el posible efecto en la determinación de la actividad peroxidásica del tiempo de corte de las hojas en análisis. Se probaron dos tiempos, 5 min y 10 h, previa la preparación del extracto. Se prepararon los extractos de las hojas del vegetal seleccionado, expuestas a cada dosis y tiempos de ozono y se calculó la actividad peroxidásica de cada extracto, siguiendo el procedimiento descrito en 2.2.1.

El tiempo, al cual se encontró mayor actividad peroxidásica, fue seleccionado para el estudio de los análisis del efecto de la dosis de ozono sobre esta misma propiedad.

2.2.4 Análisis del efecto del ozono sobre la actividad peroxidásica y algunas propiedades físicas del vegetal seleccionado

Las plantas del vegetal seleccionado fueron introducidas en el invernadero con entrada de ozono. Las dosis aplicadas a las plantas fueron de 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 ppm de ozono durante 0.5, 1.0, 1.5, 2.04, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 h a cada dosis, para determinar la actividad peroxidásica y 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 h para la determinación del color, la consistencia y la humedad.

Determinación del efecto de la dosis de ozono y los tiempos de exposición sobre la actividad peroxidásica del vegetal seleccionado. Se prepararon los extractos de las hojas de las plantas de rábano expuestas a cada dosis y tiempos de ozono y se calculó la actividad peroxidásica de cada extracto, siguiendo el procedimiento descrito en 2.2.1.

Determinación del color y la consistencia. Luego de cada exposición, las hojas de las plantas de rábano fue-

ron fotografiadas para observar las diferencias de color y consistencia. Para esto se utilizó una escala de 0 (color y consistencia natural) a 5 (color y consistencia luego de 10.0 h de exposición), elaborada con base en los resultados de las hojas expuestas a 0.10 ppm de ozono.

Determinación de la pérdida de humedad. En lunas de reloj previamente taradas a 110 °C, durante 1 h, se colocaron las hojas de rábano luego de cada exposición. La humedad fue cuantificada por medio de la diferencia de los pesos de las hojas, tomados antes y después de colocarlas en la estufa a 110 °C, hasta peso constante.

3 Resultados y discusión

3.1 Determinación preliminar de la actividad peroxidásica en extractos de hojas de geranio, aguacate, higo y rábano

La tabla 1 muestra los resultados de las características de los extractos obtenidos de las hojas de geranio, aguacate, higo y rábano.

La característica definida como "facilidad de obtención", se relacionó con el hecho de que algunos vegetales requirieron de altas concentraciones de fase acuosa para permitir la obtención de un extracto manejable y de adecuada consistencia, porque los elementos lignocelulósicos de algunas hojas no permitían una fácil homogeneización.

En la tabla 2, se presentan los valores resultados de la actividad peroxidásica de los extractos obtenidos de cada vegetal.

La actividad peroxidásica del extracto de las hojas de rábano es mayor que la de los correspondientes al aguacate, el higo y el geranio, probablemente, porque existe mayor cantidad de isoenzimas en el extracto obtenido, las cuales aportan a la actividad peroxidásica en este extracto [7].

En la composición química del aguacate se presentan altas cantidades de lípidos, lo que, posiblemente, produce más radicales libres luego de un ataque oxidativo. Estos radicales libres (del oxígeno y de los lípidos) generan reacciones en cadena, que originan un desbalance en las cantidades de antioxidantes y pro-oxidantes y la cantidad de proteína no es suficiente para detener estas reacciones, por ello, la actividad peroxidásica es menor, comparada con la del extracto de hojas de rábano [9, 11].

En el extracto de hoja de higo, no se pudo determinar la actividad peroxidásica, debido a que las lecturas de absorbancia eran menores que las del blanco, lo cual puede deberse a numerosos factores, desde interferencias por presencia de otras sustancias, hasta complejos sistemas de reacciones enzimáticas que no permiten evaluar este parámetro.

Tabla 1. Características físicas de los extractos obtenidos de las hojas de geranio, aguacate, higo y rábano

Vegetal	Características de los extractos				
	Facilidad de obtención	Color		Consistencia	
		Inicial	Final	Sin centrifugar	Centrifugado
Geranio	Sí	Verde natural*	Amarillo muy claro	Líquido homogéneo	Líquido transparente
Aguacate	No	Verde natural*	Café claro	Semisólido heterogéneo	Líquido café
Higo	No	Verde natural*	Verde claro	Semisólido heterogéneo	Líquido verde
Rábano	Sí	Verde natural*	Verde claro	Pastoso homogéneo	Líquido verde

La actividad peroxidásica del extracto de las hojas de geranio es nula debido, probablemente, a que en la obtención del extracto, la solución de K_2HPO_4 no disolvió las enzimas presentes en el mismo.

Tabla 2. Actividad peroxidásica de los extractos de hojas de los vegetales utilizados, durante los primeros 15 s de reacción

Vegetal	Actividad peroxidásica* ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$)
Geranio	0.000
Aguacate	7.897 ± 1.437
Higo	ND [†]
Rábano	24.738 ± 2.148

*Valor promedio.

[†]No pudo determinarse, porque el valor era negativo.

3.2 Determinación de los efectos del tratamiento con ozono de las hojas de los vegetales utilizados

Por los resultados anómalos presentados por el higo, este ya no fue considerado en las siguientes pruebas. En la tabla 3, se indican los valores de actividad peroxidásica de los extractos de cada vegetal.

Tabla 3. Actividad peroxidásica de los extractos de hojas de los vegetales utilizados, tratados con O_3 durante los primeros 15 s de la reacción

Vegetal	Actividad peroxidásica* ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$)
Geranio	0.000
Aguacate	0.000
Rábano	9.614 ± 1.743

*Valor promedio.

La actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de geranio y aguacate expuestas a O_3 , es igual a cero.

Entre los extractos de las hojas de rábano con y sin O_3 , se observa que el extracto de las hojas ozonificadas

tiene un valor de actividad peroxidásica menor que el de las hojas sin ozonificar; lo que podría indicar un posible potencial de las peroxidases para ser usadas como un bioindicador de la contaminación atmosférica con O_3 , dado que ya se han hecho otros estudios sobre su uso como bioindicadores generales de la calidad del aire [8].

Los resultados observados de variación de actividad peroxidásica permiten seleccionar al rábano para continuar con la investigación.

3.3 Efecto del tiempo transcurrido entre el corte y el análisis sobre la actividad peroxidásica de las hojas del vegetal seleccionado

Los resultados de la actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de las plantas de rábano cortadas 5 min antes de la preparación del extracto y de las hojas cortadas 10 h antes de la obtención del extracto, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de plantas de rábano cortadas 5 min y 10 h antes del análisis

Paralela	Actividad peroxidásica ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$)	
	Hojas cortadas 10 h antes	Hojas cortadas 5 min antes
1	23.822	2.035
2	26.352	2.102
3	21.592	2.759
4	25.746	2.856
Promedio	24.378 ± 1.860	2.438 ± 0.372

La actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de rábano, recolectadas 10 h antes de la obtención de los mismos ($24.378 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$), es diez veces mayor que la del extracto de las hojas cortadas de las plantas 5 min antes del análisis ($2.438 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$). Se puede suponer que el corte es un proceso que activaría a las

enzimas peroxidadas y el tiempo de activación no sería instantáneo, sino que requiere de algunas horas. El corte establece un nivel de estrés en el sistema oxidativo que promueve la activación enzimática asociada (Céspedes y Sánchez, 2000).

3.4 Efecto de la atmósfera ozonificada sobre la actividad peroxidásica, el contenido de vitamina C y algunas propiedades físicas en las hojas del vegetal seleccionado

3.4.1 Actividad peroxidásica

La tabla 5 muestra los resultados estadísticos a todos los valores de dosis de ozono de 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 ppm, comprendidos en los llamados "puntos" y a todos los tiempos de exposición, del análisis global de rango múltiple de actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de rábano, para grupos homogéneos, con relación al tiempo de exposición a O₃.

Tabla 5. Prueba de rango múltiple de la actividad peroxidásica de los extractos de hojas de rábano respecto al tiempo de exposición a O₃

Tiempo de exposición a O ₃ (h)	Número de puntos	Media global	Grupos homogéneos		
0.5	4	0.3275	X		
2.5	4	0.3365	X		
2.0	4	0.3440	X		
1.5	4	0.3600	X		
1.0	4	0.3770	X		
3.0	4	0.5188		X	
4.0	4	0.5920		X	
6.0	4	0.6250		X	
10.0	4	0.9868			X
8.0	4	1.0948			X

La figura 1 es un ejemplo donde se observa la actividad peroxidásica en función del tiempo de exposición a O₃.

Durante las primeras horas de exposición, no se observa una tendencia estable para ninguna dosis. Este primer conjunto de datos, entre 0.5 y 2.5 h, conforma un grupo homogéneo, el cual corresponde a los valores más bajos registrados de actividad peroxidásica. Los tiempos de exposición a O₃ de 3.0, 4.0 y 6.0 h corresponden al grupo homogéneo con valores medios de actividad peroxidásica, mientras que tiempos de 8.0 y 10.0 h corresponden al grupo homogéneo cuya actividad peroxidásica es mayor, como se observa en la tabla 5. Al aumentar el tiempo de exposición a O₃, las gráficas muestran una disposición general al incremento de la actividad peroxidásica respecto al tiempo de exposición. La tendencia

creciente de la actividad peroxidásica puede ser producida debido a que la cantidad de oxidante que se encuentra en los tejidos de las hojas ha generado mayor número de radicales libres y las enzimas deben incrementar su actividad peroxidásica.

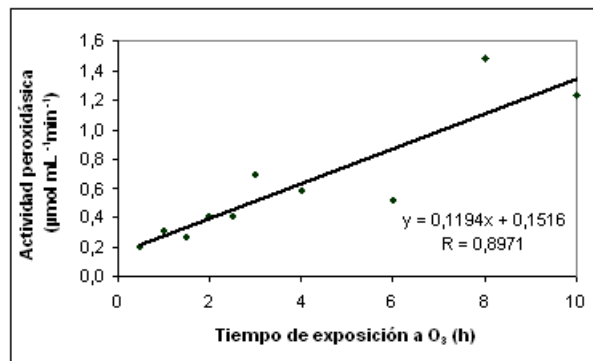


Figura 1. Actividad peroxidásica del extracto de las hojas de plantas de rábano expuestas a 0.06 ppm de O₃

La figura 2 es un ejemplo donde se muestran los valores de actividad peroxidásica en función de la dosis de O₃, a un tiempo de exposición.

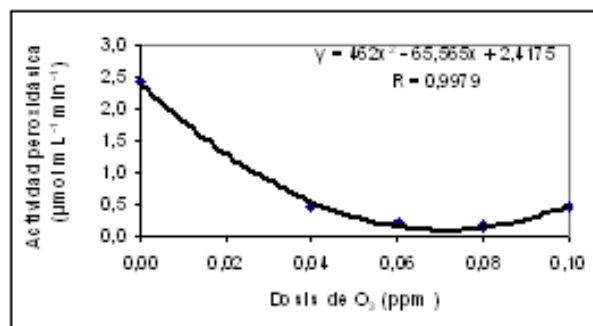


Figura 2. Actividad peroxidásica del extracto de las hojas de rábano en función de la dosis de O₃ a un tiempo de exposición de 0.5 h

En forma general, se observa que los extractos de las hojas de rábano presentan un valor de actividad peroxidásica más alto cuando la planta (cuyas hojas fueron arrancadas 5 minutos antes de la obtención del extracto) no ha sido tratada a ninguna dosis de O₃; mientras que, los valores de la actividad, a cualquier dosis suministrada, varían según el tiempo de exposición, pero siempre el valor más bajo correspondería a un valor cercano a la dosis de 0.08 ppm de O₃, según las curvas presentadas de regresión polinómica cuadrática. Respecto a los tiempos de exposición al O₃, desde las 0.5 hasta las 10.0 h, según las curvas de regresión, la actividad peroxidásica disminuye con la dosis de O₃ hasta las 0.08 ppm y luego, a 0.10 ppm, nuevamente aumenta y, posiblemente, a dosis de O₃ mayores a 0.10 ppm, la actividad peroxidásica aumenta. Estas gráficas se presentan como funciones cuadráticas positivas con correlaciones R mayores a 0.89.

Estadísticamente, existe una diferencia significativa respecto a la dosis de O₃, en 0.08 ppm ($p < 0.05$), como se observa en la tabla 6, puesto que la media global de

la actividad peroxidásica, a esta dosis, es casi la mitad de la media global para el resto de dosis, lo que podría indicar que a 0.04 y 0.06 ppm de O₃, las peroxidasas se ven igualmente afectadas por el oxidante, posiblemente porque son concentraciones bajas y la producción de radicales libres es menor que a concentraciones de O₃ mayores. Entre las 0.08 y las 0.10 ppm de O₃ las plantas de rábano podrían haber sufrido un ataque oxidativo más intenso que a 0.04 y 0.06 ppm y la actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de rábano aumenta. Este aumento de la actividad peroxidásica a 0.08 y 0.10 ppm tiene lugar debido a la adaptación de las peroxidasas a la cantidad de O₃, dado que, en muchos casos, el funcionamiento de los sistemas de defensa actúa en condiciones drásticas de estrés oxidativo. Además, las isoenzimas y las moléculas no enzimáticas, que sirven de mecanismo de defensa y las otras sustancias que pueden actuar como sustratos secundarios, que se encuentran en el extracto obtenido, pueden interferir en el resultado de la actividad peroxidásica, lo que hace que esta aumente.

Tabla 6. Prueba de rango múltiple para el porcentaje de pérdida de humedad en hojas de rábano tratadas con diferentes dosis de O₃

ppm de O ₃	Nº puntos	Media global	Grupos homogéneos	
0.04	6	29.023 3	X	
0.08	6	40.431 7		X
0.10	6	42.588 3		X
0.06	6	44.180 0		X

3.4.2 Color y consistencia

La figura 3 indica la pérdida de color en las hojas de rábano expuestas a O₃, a diferentes tiempos de exposición.

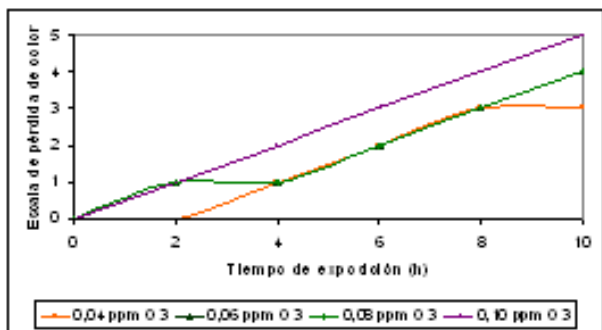


Figura 3. Pérdida de color en hojas de rábano tratadas con diferentes dosis de O₃

Se puede observar que a cualquier dosis de O₃, la pérdida de color en las hojas de rábano aumenta con el tiempo de exposición. Este comportamiento tiene lugar, debido a que el O₃, que ingresa a los tejidos de las hojas a través de los estomas, genera especies reactivas que reaccionan con los pigmentos de la planta, como los tocofe-

roles y los carotenoides, que sirven como antioxidantes no enzimáticos (McKersie, 1996).

La figura 4 indica la pérdida de consistencia en las hojas de rábano expuestas a O₃, a diferentes tiempos de exposición.

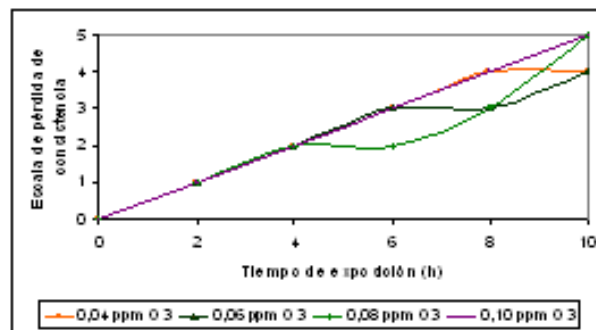


Figura 4. Pérdida de consistencia en hojas de rábano tratado con diferentes dosis de O₃

La pérdida de la consistencia natural de las hojas de rábano, hasta las 4.0 h de exposición a O₃, presenta los mismos valores en todas las dosis y luego de 4.0 h, la dosis de 0.08 ppm, al igual que 0.10 ppm de O₃, son las que registran la mayor pérdida de consistencia. La pérdida de consistencia puede ser resultado del efecto adverso que producen los radicales libres sobre las proteínas, como la actina, que sirven de cuerpos estructurales para los tejidos de las plantas (Segura, 2001).

3.4.3 Humedad

En la tabla 6 se muestra el análisis global de rango múltiple del porcentaje de pérdida de humedad para grupos homogéneos con relación a la dosis de O₃. La figura 5 muestra la pérdida de humedad respecto al tiempo de exposición al O₃.

Letras diferentes determinan diferencias significativas figura 5. Porcentaje de pérdida de humedad en hojas de rábano tratadas con diferentes dosis de O₃.

Se puede observar que, conforme aumenta el tiempo de exposición, a cualquier dosis de O₃, la pérdida de humedad es creciente. La diferencia de pérdida de humedad entre los grupos homogéneos puede ser, posiblemente, porque a 0.04 ppm de O₃, el oxidante produce una cantidad más baja de radicales libres en los tejidos de las hojas, que las demás dosis, por ello, se requiere menor cantidad de agua para la eliminación de los radicales libres.

Las diferencias significativas se presentan a distintas dosis en cada prueba; sin embargo, entre las dosis de 0.08 y 0.10 ppm de O₃, se observa que los resultados tienen relación con lo esperado según la bibliografía; es decir, la actividad peroxidásica y la pérdida de humedad aumentan debido al incremento de la concentración de O₃. Al observar estos resultados, se podría considerar el uso de las hojas de rábano como bioindicador de contaminación atmosférica a partir de las 0.08 ppm de O₃ y utilizar dosis del oxidante mayores que 0.10 ppm.

4 Conclusiones

1. La actividad peroxidásica de los extractos de las hojas de geranio, aguacate, higo y rábano, se ve afectada por la presencia de otras sustancias presentes en los mismos extractos.
2. La actividad peroxidásica del extracto de las hojas de rábano aumenta con el tiempo de exposición al ozono. Respecto a las dosis de ozono suministradas, entre 0.04 y 0.06 ppm, la actividad peroxidásica no varía; mientras que, entre 0.08 y 0.10 ppm, la actividad peroxidásica aumenta debido a la posible inactivación de algunas enzimas o al desbalance entre prooxidantes y antioxidantes, o una combinación de ambos.
3. La cantidad de agua en las hojas de rábano disminuye al aumentar el tiempo de exposición a ozono. Respecto a la dosis de ozono, en general, no existen diferencias significativas y la cantidad de humedad en las hojas de rábano disminuye entre las dosis de 0.04 y 0.10 ppm de ozono.
4. Las características físicas, como el color y la consistencia de las hojas de rábano, disminuyen cuando el tiempo de exposición a ozono es mayor.

Referencias

- [1] Benítez, D., 2006. *Vitaminas y oxidoreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo*. Revista cubana de investigaciones biomédicas, 25 (2), 1.
- [2] Carrillo, N. y Valle, E., 2006. *El lado oscuro del oxígeno*. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad del Rosario, Argentina, pp. 3, 6, 8-10.
- [3] Contreras, J., 2002. *Polución aérea*. <http://facultad.usfq.edu.ec/cesarz/Cursos/CosFolder/Poluc.html>, Febrero, 2006.
- [4] Doménech, X., 1995. *Química atmosférica, origen y efectos de la contaminación*. 2da. edición, Miraguano Ediciones, Madrid, España, pp. 57, 64.
- [5] Faloci, M., Tarragó, J., Luna, C., Sansberro, P. y Mroginski, L., 2003. *Determinación de enzimas peroxidadas en tejidos caulinares de Ilex dumosa R. e Ilex paraguariensis St. Hil.* Resumen A-042, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, p. 2.
- [6] Fernández, A., Peteira, B., González, M. y Lines, L., 2003. *Actividad peroxidasa, polifenoloxidasas, fenilalanina amino liasa y glucanasa en somaclones y mutantes de arroz*. Revista Protección Vegetal, 18 (3), 183.
- [7] Kay, E., Shih, J., Shannon, L. y Lew, J., 1971. 1971 *Peroxidase isoenzymes from horseradish roots*. Biology Chemistry, 246 (14), 4546.
- [8] Li, M., 2003. *Peroxidase and superoxide dismutase activities in fig leaves in response to ambient air pollution in a subtropical city*. Archives of environmental contamination and toxicology, Taipei, 45 (2), 168.
- [9] McKersie, B., 1996. *Oxidative stress*. <http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm>, Diciembre, 2007.
- [10] Noroña, C., 2002. *Estudios preliminares del efecto del uso del agua tratada con ozono en el control microbiológico de vibrio spp en la producción de camarones*. Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, p. 120.
- [11] Tiskow, G., 1996. *Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión*. Revista Pegasus, 2 (1), 44.