



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

Tratamientos Poscosecha para el Control de los
Daños por Frío en Frutos Climatéricos y No
Climatéricos

D^a. María del Carmen Romojaro Casado

2016

D^a **MARÍA CONCEPCIÓN MARTÍNEZ MADRID**, Profesora Titular de Universidad del Área de Edafología y Química Agrícola en el Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche, D^a **MARÍA TERESA PRETEL PRETEL**, Profesora Titular de Universidad del Área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y D^a **PALOMA SANCHEZ BEL**, Personal investigador (Programa Ramón y Cajal) del Área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universidad Jaume I, **AUTORIZAN:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada *Tratamientos poscosecha para el control de los daños por frío en frutos climatéricos y no climatéricos*, realizada por D^a **MARÍA DEL CARMEN ROMOJARO CASADO**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Orihuela, a 11 de noviembre de 2015

D^a M.T Pretel Pretel

D^a M.C. Martínez Madrid

D^a P. Sánchez Bel

Agradecimientos

Con estas líneas deseo dar mi más sincero agradecimiento a las personas que han participado en este proyecto, sin cuya colaboración y apoyo continuo habría sido imposible la realización de esta Tesis Doctoral, así como a las cooperativas de Cartagena y de Granada que nos han suministrado los calabacines y chirimoyas.

A las directoras de esta Tesis, las doctoras D^a M^a Teresa Pretel Pretel, D^a M^a Concepción Martínez Madrid y D^a Paloma Sánchez Bel, por su apoyo y dedicación absoluta, que han sido imprescindibles para llevar a cabo este trabajo.

A la doctora D^a María Serrano por sus inestimables consejos y disponibilidad en todo momento.

A D^a Consuelo Saura, por su participación directa en este proyecto, por compartir todos sus conocimientos conmigo en el laboratorio, y sobre todo por su buen humor en todo momento. Gracias Chelo por tratarme tan bien.

A los alumnos de Orihuela Ana Verónica, M^a Victoria y Marina por su colaboración y ayuda en la parte experimental del trabajo.

A mi familia, por su paciencia, ánimo y confianza, y en especial a mi padre por resolver cualquier duda surgida a lo largo de este trabajo.

A Emilio por su comprensión, ánimo y cariño, así como por sus conocimientos en informática que fueron de gran ayuda.

A todos mis amigos, que en cierta manera han colaborado para que yo haya llegado hasta aquí.

A mi familia y a mis directoras

ÍNDICE	i
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
LISTADO DE ABREVIATURAS	ix
1.- INTRODUCCION	1
1.1. LOS DAÑOS POR FRIO EN FRUTAS Y HORTALIZAS	3
1.1.1. Etiología de los daños por frío en la posrecolección	3
1.1.2. Manifestaciones fisiológicas de los daños por frio	11
1.1.3. Papel de las hormonas en los daños por frio	14
<u>1.1.3.1. Efecto de las bajas temperaturas sobre la biosíntesis y la producción de etileno</u>	14
<u>1.1.3.2. Efecto del etileno sobre el desarrollo de los daños por frio</u>	17
<u>1.1.3.3. Interacción de otras hormonas con los daños por frio</u>	19
1.1.4. Acción de proteínas específicas en respuesta a las bajas temperaturas	22
1.1.5. Control de los daños por frio	23
<u>1.1.5.1. Tratamientos físicos</u>	23
<u>1.1.5.2. Tratamientos térmicos</u>	25
<u>1.1.5.3. Tratamientos químicos</u>	26
<u>1.1.5.4. Tratamientos con radiación ultravioleta de onda corta</u>	34
1.2. MODIFICACIONES DEL ESTADO OXIDATIVO DE LOS FRUTOS ASOCIADOS A LOS DAÑOS POR FRIO.	35
1.2.1. Estrés oxidativo	35
<u>1.2.1.1. Mecanismos bioquímicos responsables del estrés oxidativo</u>	37
<u>1.2.1.2. Efecto del estrés oxidativo sobre las células</u>	40
1.2.2. Mecanismos antioxidantes de defensa	41
<u>1.2.2.1. Sistemas enzimáticos</u>	41
<u>1.2.2.2. Sistemas no enzimáticos</u>	42
1.2.2.2.1. <i>Ácido ascórbico</i>	43
1.2.2.2.2. <i>Carotenoides</i>	44

1.2.2.2.3. <i>Compuestos fenólicos</i>	44
1.3. EL CALABACÍN	46
1.3.1. Origen	46
1.3.2. Taxonomía y morfología	46
1.3.3. Importancia económica y distribución geográfica	50
1.3.4. Composición química y valor nutricional	53
1.3.5. Comportamiento del calabacín en posrecolección	54
1.4. LA CHIRIMOYA	61
1.4.1. Origen	61
1.4.2. Taxonomía y morfología	61
1.4.3. Importancia económica y distribución geográfica	63
1.4.4. Composición química y valor nutricional	65
1.4.5. Comportamiento de la chirimoya en posrecolección	65
2.- OBJETIVOS	75
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.1. MATERIAL VEGETAL	81
3.1.1. Calabacín	81
3.1.2. Chirimoya	81
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	82
3.2.1. Calabacín	82
3.2.2. Chirimoya	83
3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	86
3.3.1. Análisis fisicoquímicos y fisiológicos	86
<u>3.3.1.1. Pérdida de peso</u>	86
<u>3.3.1.2. Daños por frío</u>	86
<u>3.3.1.3. Sólidos solubles totales, acidez valorable y pH, en pulpa de chirimoya</u>	87
<u>3.3.1.4. Producción de etileno</u>	87

<u>3.3.1.5. Color de los frutos</u>	88
3.3.2. Análisis del estado oxidativo de las membranas	89
<u>3.3.2.1. Salida de electrolitos</u>	89
<u>3.3.2.2. Índice de peroxidación lipídica</u>	89
3.3.3. Análisis del estado oxidativo de los frutos	90
<u>3.3.3.1. Extracción para la determinación del contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante total (TEAC)</u>	90
3.3.3.1.1.- <i>Medida del contenido en fenoles totales</i>	90
3.3.3.1.2.- <i>Medida de la capacidad antioxidante total en equivalentes de Trolox (TEAC)</i>	90
<u>3.3.3.2. Determinación de ácido ascórbico libre</u>	91
3.3.4. Análisis de sistemas antioxidantes enzimáticos	92
<u>3.3.4.1. Actividad catalasa (CAT)</u>	93
<u>3.3.4.2. Actividad peroxidasa (PX)</u>	93
<u>3.3.4.3. Determinación del contenido proteico</u>	94
3.3.5. Análisis estadístico	94
4.- RESULTADOS Y DISCUSION	95
4.1. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS	97
4.1.1. Evolución de la pérdida de peso	97
4.1.2. Evolución de los daños por frio	101
4.1.3. Evolución de parámetros fisiológicos en chirimoya	107
4.1.4. Evolución de la producción de etileno	110
4.1.5. Evolución del color	114
4.2. ANÁLISIS DEL ESTADO OXIDATIVO DE LAS MEMBRANAS	118
4.2.1. Evolución del porcentaje de salida de electrolitos	119
4.2.2. Evolución de la peroxidación lipídica	123
4.3. EVOLUCIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO	126
4.3.1. Evolución del contenido en fenoles totales	126
4.3.2. Contenido en ácido ascórbico libre	132

4.3.3. Capacidad antioxidante total en equivalentes de Trolox (TEAC)	136
4.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	141
4.4.1. Evolución de la actividad catalasa	142
4.4.2. Evolución de la actividad peroxidasa	146
5.- CONCLUSIONES	151
6.- BIBLIOGRAFÍA	157

RESUMEN

Dado que en los frutos climatéricos la mayoría de los procesos relacionados con la maduración están regulados por el etileno, esta hormona podría participar en el desarrollo de los daños por frío (DF). En el caso de los frutos no climatéricos, aunque el etileno no interviene en el desencadenamiento y desarrollo de la maduración, podría también tener un efecto inductor de los DF en las especies sensibles, ya que también el deterioro se inicia por la degradación de las membranas celulares. En la presente Memoria se realizó un estudio de conservación de dos frutos sensibles a DF, uno climatérico como la chirimoya y otro no climatérico como el calabacín, a temperatura que no causa DF (10°C para calabacín y 12°C para chirimoya) y temperatura que causa DF (1°C para calabacín y 4°C para chirimoya). Tras un periodo de mantenimiento a temperatura ambiente se analizaron los síntomas de DF, las modificaciones de compuestos característicos de la calidad, del estrés oxidativo de las membranas celulares, y los mecanismos antioxidantes de defensa enzimáticos y no enzimáticos.

Los resultados mostraron que la conservación a temperaturas de DF retardó la pérdida de peso en ambos frutos, en relación a la temperatura de no daño. Los primeros síntomas visibles de DF en calabacines conservados a 1°C se detectaron a partir de los 12 días. El reacondicionamiento a 20°C agravó la deshidratación de los frutos y los DF. Los tratamientos con 1-MCP y etileno, previos a la conservación a 1°C de frutos de calabacín, parecen no tener efecto o incluso agravar los síntomas de daños causados por el frío, más que proteger frente a este factor de estrés. Por otro lado, a pesar de no presentar síntomas visibles de deterioro, los DF en chirimoya se manifestaron en una maduración anómala, considerando la evolución de los sólidos solubles, acidez, pH y color durante su almacenamiento.

En frutos sensibles a DF, las temperaturas de refrigeración superiores a la temperatura de congelación provocan la pérdida de estructura de la bicapa lipídica y finalmente la lisis celular. En este trabajo se estimó el estado oxidativo y la integridad de las membranas celulares mediante el porcentaje de salida de electrolitos y el contenido en peróxidos lipídicos. En calabacín, el almacenamiento a 1°C provocó un aumento significativo de la salida de electrolitos y de la peroxidación lipídica. La respuesta ante el estrés provocado por las bajas temperaturas en los frutos de calabacín fue siempre mayor en piel que en pulpa, ya que es en la piel donde se desarrolla principalmente la fisiopatía de los daños por frío. Las chirimoyas conservadas a 12°C presentaron mayor salida de electrolitos y peroxidación lipídica que cuando se almacenaron a 4°C, confirmando que a 12°C ocurre la desestructuración de las membranas, típica del proceso de maduración, que no llega a ocurrir a 4°C.

Hoy día se considera que en la maduración y senescencia de los frutos están implicados procesos oxidativos. Para evitar estos daños, la célula ha desarrollado en las

plantas captadores de oxígeno o antioxidantes, vías metabólicas de detoxificación enzimática y mecanismos de reparación. Paralelamente a la producción de especies reactivas de oxígeno, las plantas se protegen de los efectos del estrés mediante un sistema antioxidante complejo que incluye la síntesis de metabolitos antioxidantes. En este trabajo se encontró que el contenido en compuestos fenólicos se incrementó durante la primera semana de conservación en la piel de ambos frutos, especialmente en calabacines conservados a temperatura de daño (1°C) y en chirimoya conservada a temperatura de no daño (12°C). En el primer caso coincidiendo con la fase de alarma frente al estrés, y en el segundo coincidiendo con el proceso normal de maduración de la chirimoya. El contenido de fenoles en la pulpa de ambos frutos fue menos sensible que la piel, a los cambios de temperatura y los tratamientos. No se apreció ningún efecto significativo de los tratamientos sobre los niveles de ácido ascórbico en la piel de calabacín ni chirimoya. Las bajas temperaturas afectaron de forma diferente a la capacidad antioxidante de la piel y la pulpa de ambos frutos. Mientras que en piel la conservación a temperatura de DF disminuyó la capacidad antioxidante, en pulpa se incrementó este parámetro. Los tratamientos con etileno y su antagonista no tuvieron un efecto claro sobre la capacidad antioxidante, por lo que no parece que el etileno esté implicado en los mecanismos no enzimáticos de detoxificación de estos frutos.

Dentro de los sistemas de detoxificación enzimáticos, el aumento de las actividades peroxidasa y catalasa conjuntamente, como respuesta a un estrés oxidativo conlleva una disminución del peróxido de hidrógeno producido y, por tanto, un incremento de la tolerancia hacia los daños por frío. En calabacín, la disminución de la actividad catalasa, el aumento de salida de electrolitos y el aumento de los síntomas visibles de daños por frío, apuntan a un alto grado de deterioro de los tejidos y a la desorganización estructural, como consecuencia del daño, y a la incapacidad de los mismos para responder de manera defensiva al estrés oxidativo derivado del exceso de radicales y especies reactivas de oxígeno generados. Por lo tanto el sistema es sobrepasado y ocurre daño celular y subcelular. Según los resultados obtenidos en la presente memoria, se puede pensar en la posible contribución de la catalasa para rebajar el estrés oxidativo en pulpa de chirimoya.

En piel de calabacín se observó una activación de la actividad peroxidasa en los frutos como consecuencia del estrés oxidativo provocado por las bajas temperaturas. Los tratamientos con 1-MCP o etileno redujeron ligeramente la actividad peroxidasa en este tejido. Finalmente, a pesar de las diferencias entre los valores de actividad en la piel o en la pulpa de chirimoyas sometidas a los diferentes tratamientos, en la mayoría de los casos, las diferencias no fueron significativas. Es por ello difícil pensar que esta enzima antioxidante juegue un papel importante en los procesos de detoxificación y en el mantenimiento del estado oxidativo celular de chirimoya.

ABSTRACT

Since most processes related to ripening are regulated by ethylene in climacteric fruits, this hormone could be implied in the development of chilling injury (CI). Regarding non-climacteric fruits, although ethylene does not take part in the triggering and development of ripening, it could also have a CI inducing effect in sensitive species, because the deterioration starts with the degradation of cell membranes. In this Report a storage study of two fruits sensitive to CI, one climacteric like cherimoya and other non-climacteric like courgette, at a temperature not causing CI (10 °C for courgette and 12 °C for cherimoya) and at a temperature causing CI (1 °C for courgette and 4 °C for cherimoya) has been carried out. After a period of storage at room temperature, the symptoms of CI, the changes in those compounds characteristics of quality, the oxidative stress of cell membranes and the enzymatic and non enzymatic antioxidant defence mechanisms were analysed.

The results showed that storage at CI temperatures delayed the weight loss in both fruits, in comparison to the non-CI temperature. The first visible symptoms of CI in courgettes stored at 1 °C were found after 12 days. The reconditioning at 20 °C worsened the dehydration of fruits and the CI. The treatments with 1-MCP and ethylene before storage at 1 °C of courgette fruits seem to have no influence or to worsen the symptoms of CI instead of protecting against this stress factor. On the other side, despite they do not present visible symptoms of deterioration, CI in cherimoya fruits were evident in an anomalous ripening when considering the evolution of soluble solids, acidity, pH and colour.

In fruits sensitive to CI, the refrigeration temperatures over the freezing point cause an increase of the non-specific permeability to ions and renders the enzymes linked to the membrane inactive; the result is the loss of the structure of the lipid bilayer and, finally, the cell lysis. In this work, the oxidative state and the integrity of cell membranes were assessed by the percentage of electrolyte leakage and the content of lipid peroxides. In courgette, the storage at 1 °C caused a significant increase of the electrolyte leakage and the lipid peroxidation, both in control fruits and in fruits treated with 1-MCP. The treatment with ethylene stressed the degradation of the membrane structures caused by cold. The response against the stress caused by low temperatures in courgette fruits was always higher in the skin than in the pulp, because the physiopathy of chilling injury develops mainly in the skin. The cherimoyas stored at 12 °C showed higher electrolyte leakage and lipid peroxidation than those stored at 4 °C, so it can be stated that at 12 °C the membrane disintegration typical of the ripening process occurs, a fact not occurring at 4 °C.

Today, it is considered that, during ripening and senescence of the fruits, oxidative processes are implied in order to avoid these damages. The plant cell has developed oxygen scavengers or antioxidants, metabolic paths of enzymatic detoxification and repair mechanisms. In parallel with the production of oxygen reactive species, plants protect themselves against the effects of stress by a complex antioxidant system that includes the synthesis of antioxidant metabolites. In this work, it was observed that the content of phenolic compounds increased during the first week of storage in the skin of both fruits, specially in courgettes stored at CI temperature (1 °C) and in cherimoya stored at non-CI temperature (12 °C). In the first case, it occurs at the same moment as the stage of alarm against stress and, in the second one, during the normal process of ripening of cherimoya. The content of phenols in the pulp of both fruits was less sensitive to temperature changes and treatments than the skin. There was not a significant effect of treatments on the levels of ascorbic acid in the skin of courgette or cherimoya. Low temperatures affected in different ways the antioxidant capacity of skin and pulp in both fruits. While in skin the storage at CI temperature decreased the antioxidant capacity, this parameter increased in pulp. The treatment with ethylene and its antagonist did not clearly affect the antioxidant capacity, so it seems that ethylene is not involved in non-enzymatic detoxification mechanisms of these fruits.

Considering the enzymatic detoxification systems, the increase of peroxidase and catalase activities as a joint response to oxidative stress implies a decrease of the hydrogen peroxide produced and, therefore, an increase of the tolerance towards chilling injury. While the catalase presents a high reaction speed and a low affinity for hydrogen peroxide, the peroxidase has a great affinity for hydrogen peroxide and makes small H₂O₂ uptakes in specific locations. Its antioxidant capacity depends on the stress severity and on the species and their development state. In courgette, the decrease of the activity of catalase, the increase of the electrolyte leakage and the increase of the visible symptoms of chilling injury point at a high degree of deterioration of tissues and structure disintegration, as a consequence of the damage and their inability to defensively respond to oxidative stress caused by the excess of radicals and oxygen reactive species, so the cell and subcell damage occurs. According to the results obtained in this report, it is difficult to believe that catalase plays a significant role in detoxification processes and in the maintenance of the cell oxidative state of cherimoya skin. In courgette skin there was an activation of the peroxidase activity in fruits as a consequence of the oxidative stress caused by low temperatures. The treatments with 1-MCP or ethylene slightly reduced the peroxidase activity in this tissue. Finally, despite the differences between the values of activity in skin or pulp of cherimoya that underwent the different treatments, in most cases, the differences were not significant or values were very low. Then, it is difficult to believe that this antioxidant enzyme plays a significant role in detoxification processes and in the maintenance of the cell oxidative state of cherimoya.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre desarrollado
ABA	Ácido abcísico
AC	Atmósfera controlada
ACC	Ácido-1-aminociclo-propano-1-carboxílico
ACO	ACC-oxidasa
ACS	ACC-sintasa
ADC	Arginina descarboxilasa
AM	Atmósfera modificada
ASC	Ácido ascórbico/ascorbato
AOX	Oxidasa alternativa
AOA	Ácido aminooxiacético
APX	Ascorbato peroxidasa
AVG	Ácido aminotoxivinilglicina
CAT	Catalasa
CP	Ciclopropeno
DACP	Diazociclopentadieno
DF	Daños por frío
DHA	Ácido dehidroascórbico
3,3-DMCP	3,3- Dimetil ciclopropeno
EXP	Expansinas
GPX	Glutación peroxidasa

GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Disulfuro de glutación/glutación oxidado
HSPs	Proteínas de estrés
HWD	Hot Water Dip
HWRB	Hot Water Rinsing and Brushing
IW	Tratamientos intermitentes
JA	Ácido jasmónico
LOX	Lipoxigenasa
LRS	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa
MACC	Ácido 1-(malonilamino) ciclopropano-1-carboxílico
MDA	Malondialdehído
MDHA	Ácido monodehidroascórbico
1-MCP	1-Metilciclopropeno
MeJA	Metil jasmonato
2,5-NBD	2,5-norbornadieno
PA _s	Poliaminas
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PG	Poligalacturonasa
PLC	Fosfolipasa
PME	Pectinmetilesterasa
POD	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa

PX	Peroxidasas inespecíficas
Put	Putrescina
ROS	Reactive Oxygen Spices
SA	Ácido salicílico
SAM	S-adenosilmetionina
dSAM	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SOD	Superóxido dismutasa
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
XET	Xiloglucano endotransglicosilasas

Introducción

1.1.- LOS DAÑOS POR FRÍO EN FRUTAS Y HORTALIZAS

1.1.1.- Etiología de los daños por frío en la posrecolección

En los animales de sangre caliente se han desarrollado sistemas de regulación térmica, que les permiten amortiguar las diferencias entre su temperatura y la del medio exterior. Los vegetales no tienen esta posibilidad y la intensidad a la que tienen lugar los procesos metabólicos a nivel celular depende estrechamente de ambas temperaturas.

En general las bajas temperaturas, por encima del punto de congelación, estabilizan los sistemas y ralentizan todos los procesos que de una forma directa e indirecta deterioran la calidad de los frutos. Esta circunstancia motivó que la tecnología más utilizada para la conservación de productos vegetales en fresco durante la posrecolección sea el frío. En efecto, permite mantener la calidad una vez recolectados de la mayoría de los productos perecederos al ralentizar el metabolismo celular y los procesos de maduración y senescencia (Handerburg et., 1986).

Debido a su composición, los frutos y las hortalizas son sistemas altamente inestables y se alteran con facilidad tanto por procesos enzimáticos como por reacciones químicas. Es interesante considerar que la actividad enzimática puede deberse a las propias del vegetal o de agentes microbianos contaminantes externos. La temperatura puede afectar a numerosos procesos fisiológicos complejos, tales como fotosíntesis, transpiración, maduración, senescencia, entre otros. No solo hay un efecto físico de la temperatura sobre la velocidad de la reacción, sino que también hay una influencia de los límites críticos de temperatura sobre el tejido en el que tiene lugar la reacción, como congelación, daños por frío, cambios estructurales de las membranas y proteínas en la fase de transición, choque térmico y desnaturalización térmica de las proteínas.

Independientemente de la pauta respiratoria de los frutos, las bajas temperaturas disminuyen el ritmo de deterioro, o lo que es lo mismo, la calidad se mantiene más tiempo y aumenta el periodo de vida útil. Además en el caso de los frutos climatéricos la conservación a bajas temperaturas permite retrasar el inicio de la maduración organoléptica. En efecto, el descenso de la temperatura reduce la producción de etileno y la respuesta de los tejidos a la hormona de la maduración, retrasando el inicio de la síntesis autocatalítica del etileno, por lo que cuanto más baja sea la temperatura más largo será el tiempo necesario, bajo una determinada concentración de etileno, para iniciar la maduración, como paso previo a la senescencia y deterioro de los tejidos.

Alargar el tiempo de vida útil de un fruto no solo depende de la temperatura de conservación, ya que entran en juego otros parámetros relacionados con la calidad del fruto y el estado fisiológico en el momento de la recolección. En realidad la vida útil

comercial es el tiempo que transcurre entre la calidad inicial del fruto cuando se recolecta y la calidad límite por debajo de la cual no se puede comercializar. La calidad inicial depende de numerosos factores que se pueden agrupar en agronómicos, genéticos y ambientales y su acción repercute en mayor o menor medida sobre la calidad inicial.

En la **Figura 1.1** se recoge esquemáticamente como afecta la calidad del fruto en el tiempo de conservación a una temperatura determinada.

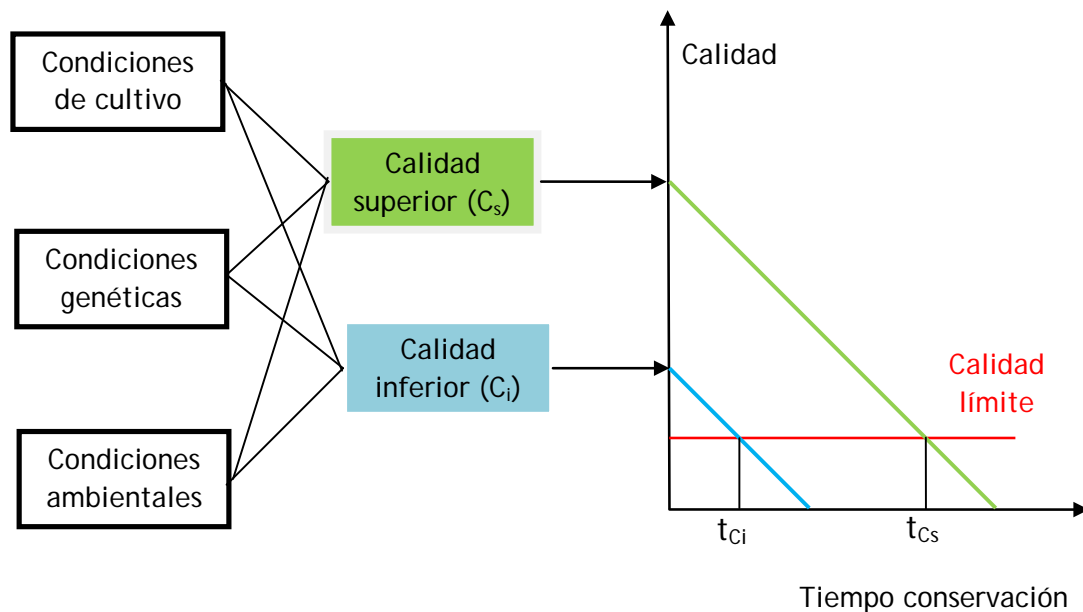


Figura 1.1.- Influencia de la calidad del fruto en el tiempo de conservación a una temperatura determinada. (Elaboración propia).

En general, cuanto mayor es la calidad de la fruta, más posibilidades tendrá de que el periodo de conservación (t_{cs}) sea más amplio, lo que favorecerá su comercialización. Una situación similar nos encontraremos si para una misma calidad determinamos el periodo de vida útil en función de la temperatura. Cuanto más baja sea la temperatura, mayor será el tiempo en que se alcanzará la calidad límite que nos exige el consumidor o el legislador. Por lo tanto, cuanto más próximos a la temperatura en la que aparecen las lesiones por congelación, que en la mayoría de los frutos se encuentra entre -1 y -5°C , más vida útil de conservación lograremos para nuestro producto.

Al poder controlar la calidad de los frutos recolectados mediante la aplicación de la refrigeración debido, a que ésta reduce sensiblemente la velocidad de los procesos del metabolismo celular, retarda los procesos de senescencia en general y la maduración en particular, ha hecho que esta tecnología esté ampliamente difundida para la conservación de los frutos en fresco.

La incidencia de las bajas temperaturas puede ser diferente en función de la ruta metabólica ya que no frena todas con la misma intensidad. En efecto, determinadas reacciones son muy sensibles a las bajas temperaturas y se detienen por completo a temperaturas inferiores a la establecida como crítica. Desde hace tiempo se han aislado varios sistemas enzimáticos muy sensibles al frío, mientras que en otros sistemas el descenso de la temperatura no frena su actividad, produciéndose por ello un acumulo de productos de reacción y probablemente una escasez de compuestos reaccionantes, al contrario de los sistemas lábiles a las bajas temperaturas. En esta situación se puede producir un desequilibrio metabólico que puede llegar a ser lo suficientemente grave para que se produzca una acumulación de productos tóxicos o la ausencia de un sustrato esencial, induciendo un funcionamiento anormal de las células que conducirá, al final, a la pérdida de su integridad y al deterioro estructural.

Es evidente que para algunas frutas y hortalizas la conservación en frío tiene efectos muy negativos, ya que la bajada de temperatura dentro de valores positivos, conlleva la aparición de síntomas externos y/o internos en el fruto, como la aparición de manchas, pardeamientos y pérdida de textura, que degradan de forma muy sensible su calidad. Esta modificación de las estructuras celulares se conoce con el nombre de "enfermedad del frío" o "chilling injury" y afecta principalmente a las especies originarias de regiones tropicales y subtropicales, y se pone de manifiesto, en la mayoría de los casos, a temperaturas superiores a 0°C, oscilando alrededor de 10°C y 15°C para las especies subtropicales y tropicales respectivamente (Wang, 1993).

En la **Figura 1.2** se muestra la respuesta a la temperatura de los frutos sensibles e insensibles al frío, y las mejores condiciones para su conservación refrigerada. Se observa que en el caso de los frutos sensibles a los daños por frío las temperaturas de conservación son algo más elevados, oscilando entre 10° y 15°C.

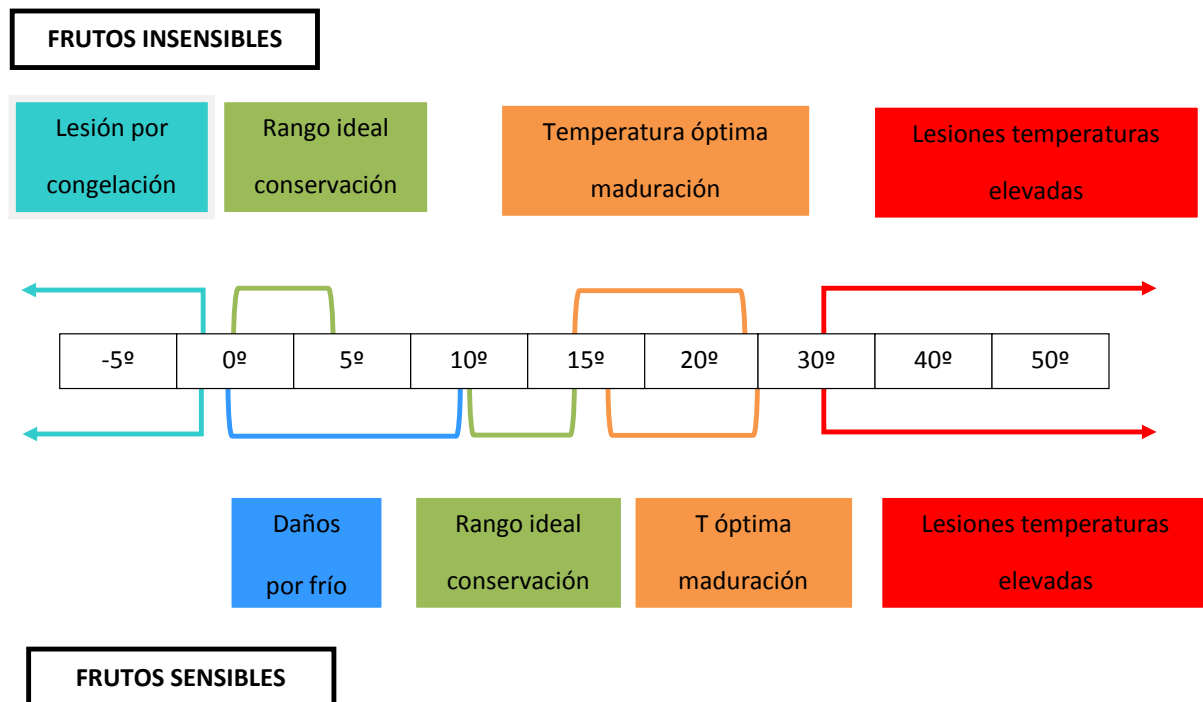


Figura 1.2. Respuesta a la temperatura en función de la sensibilidad al frío. Elaboración propia.

En la **Tabla I** se recoge una lista, no exhaustiva, de diferentes especies de frutos sensibles y no sensibles a los daños por frío. La sintomatología de esta fisiopatía es diversa y depende de la especie afectada. La sensibilidad a las bajas temperaturas es una propiedad común a los organismos vivos. En determinadas condiciones de estrés, algunas plantas se ven fuertemente afectadas frente a una bajada rápida de la temperatura, pero tienen la capacidad de recuperarse y de protegerse contra los efectos negativos. Otras plantas o partes de ellas carecen de esta capacidad y más o menos rápidamente e irreversiblemente se ven dañadas en estas circunstancias. (Coney, 1999).

Aunque hay muchas variables que afectan a la severidad de los DF, los síntomas a nivel microscópico son bastante similares en todos los frutos. Estos síntomas incluyen hinchamiento y desorganización de cloroplastos y mitocondrias, reducción en el tamaño y número de los gránulos de almidón, dilatación de los tilacoides y despilamiento de los grana, infiltración de agua en los espacios intercelulares, microvesiculación del retículo endoplásmico, acumulación de gotículas lipídicas en el interior de los cloroplastos y condensación de la cromatina nuclear (Kratsh y Wise, 2000).

Tabla I. Ejemplo de especies de frutos con diferente sensibilidad a los daños por frío. (Côme 1992).

Sensibilidad al frío	Frutas	Temperatura de conservación aconsejada(°C)
Especies resistentes	Albaricoque	-1 a 0
	Cereza	-1 a 0
	Fresa	-0,5 a 0
	Kiwi	-0,5
	Arándano	-1 a 0
	Nectarina	-1 a 0
	Pera	-1 a 0
	Manzana (algunas variedades)	-1 a 0
Uva	-1 a 0	
Especies moderadamente sensibles	Aguacate (cv Lula)	4,5
	Limón amarillo	4,5
	Mango (algunas variedades)	5,5 a 7
	Mangostán	4 a 5,5
	Melón (Cantaloupe)	4 a 7
	Naranja	2 a 7
	Manzana (algunas variedades)	4
Especies muy sensibles	Piña verde	11 a 13
	Aguacate (algunas variedades)	8 a 13
	Banana	12 a 14
	Chirimoya	8 a 9
	Limón verde	13 a 14
	Lima	8,5 a 10
	Fruta de la pasión	7 a 10
	Guayaba	8 a 10
	Mango (algunas variedades)	10 a 13
	Melón (cv HoneyDew)	7 a 10
	Pomelo	10 a 12
	Papaya	8,5 a 10
Tomates verdes	10 a 12	

Los síntomas macroscópicos con los que se manifiestan los DF en frutas y hortalizas son muy diversos, distinguiéndose dos categorías que con frecuencia se desarrollan simultáneamente en frutos tropicales y subtropicales. La primera muestra una naturaleza cualitativa y consiste en anomalías del desarrollo o del metabolismo, como la maduración incompleta y un sabor y aroma insuficientes. La segunda categoría de DF son verdaderos síntomas patológicos y se manifiestan de forma muy variada como son depresiones de la piel o picado, amarilleado anormal de la misma, descomposición de tejidos, áreas blandas y húmedas, pardeamientos internos o superficiales (escaldadura), desarrollo de textura algodonosa o harinosa en la pulpa, pardeamiento de las membranas carpelares y una menor resistencia a los daños mecánicos y al ataque microbiano (Kader, 2002). Sin embargo, algunos síntomas como la decoloración y pardeamiento interno o el desarrollo de una textura anormal de la pulpa no son visibles externamente. Esta diferente sintomatología indica que el problema de los DF no es simple ya que los mecanismos implicados pueden diferir según las especies dando lugar a una muy diferente manifestación de los mismos.

Los síntomas de DF se pueden observar en todos los estados de desarrollo de la planta, pero su gravedad depende de la intensidad del tratamiento frigorífico, del tipo de órgano vegetal de que se trate y del estado de su desarrollo. Las perturbaciones por esta patología, desarrolladas tras la recolección de órganos vegetales aislados como frutas u hortalizas y detectadas visualmente, varían entre las distintas especies e incluso entre variedades de una misma especie, y finalmente en función del medio ambiente donde se hayan cultivado (Lyons, 1973).

Se ha observado que los síntomas de esta alteración fisiológica se hacen más evidentes cuando los productos hortofrutícolas se transfieren a temperatura ambiente, llegando incluso a no detectarse hasta que no tiene lugar este reacondicionamiento (Parkin *et al.*, 1989). Sin embargo, la severidad y velocidad del desarrollo de estos síntomas puede verse afectada en función del tiempo de exposición al daño (Saltveit, 2003). Algunos síntomas (harinosidad en tomate, picaduras en pepino, y endulzamiento en patata) se ven inhibidos durante la exposición al frío. Una exposición prolongada a bajas temperaturas aumenta el nivel de daño, aunque es necesaria una duración mínima de exposición antes de que se expresen los síntomas, es así como por ejemplo, el pepino evidencia el DF como amarillamiento y una mayor susceptibilidad a las enfermedades, después de una exposición a 2,5°C superior a 3 días (Cabrera y Saltveit, 1990). En la **Tabla II** se pueden observar los diferentes síntomas visuales que encontramos en distintos productos.

Tabla II. Síntomas visibles de la enfermedad fisiológica de los “daños por frío” en diversas frutas y hortalizas (Côme, 1992).

Fruta u hortaliza	Síntomas
Piña	Pardeamiento de la pulpa
Espárrago	Alteraciones del color y ablandamiento de las puntas
Berenjena	Pardeamiento de la piel y ennegrecimiento de las semillas
Aguacate	Pardeamiento de la piel
Limón	Picado del flavedo, coloración de las membranas, manchas rojas
Pepino	Picado, tejidos inyectados en agua
Judía verde	Picado
Lima	Picado del flavedo
Mango	Oscurecimiento de la piel, manchas marrones
Melón	Picado, defectos de maduración y alteración del aroma
Aceituna	Pardeamiento de la pulpa
Naranja	Picado, pardeamiento superficial
Papaya	Picado, defectos maduración, alteración del aroma
Pimiento	Picado, pardeamiento de semillas
Patata	Sabor azucarado
Tomate verde	Defecto de maduración
Tomate maduro	Ablandamiento y tejidos inyectados de agua

En el caso concreto de los frutos, su sensibilidad hacia los DF durante la conservación a bajas temperaturas parece mostrar cierta dependencia con el estado de maduración, pero de forma diferente según la especie vegetal de que se trate. Autores como Lipton (1978) y Autio y Bramlage (1986) investigaron a cerca de la relación entre maduración y DF, y sus observaciones parecen indicar la existencia de una relación más o menos compleja entre el estado de desarrollo, la producción de etileno y los DF (Wang, 1989).

Aunque no se conoce exactamente el desarrollo de los DF, se sabe que tiene lugar en dos fases sucesivas **Figura 1.3**. La primera se prolonga desde algunas horas (caso de la banana o de la chirimoya) hasta algunos meses (en manzana y pera), aunque lo más frecuente es una duración de unas dos semanas (como sucede en pepino, judía verde, tomate, melocotón o en los cítricos). En esta fase inicial las alteraciones son tan poco severas que no se manifiestan los síntomas, es lo que se denomina umbral de inducción o fase de latencia, y los productos pueden retornar a un estado normal, por simple calentamiento superior a la temperatura crítica (es el caso de las alteraciones de tipo primario indirecto). La segunda fase tiene lugar cuando, superado el umbral de inducción, aparecen los síntomas característicos (necrosis, pardeamiento, picado etc...), su establecimiento es ya irreversible, y la aplicación de una elevación moderada de la temperatura solo contribuye a acelerar su desarrollo.

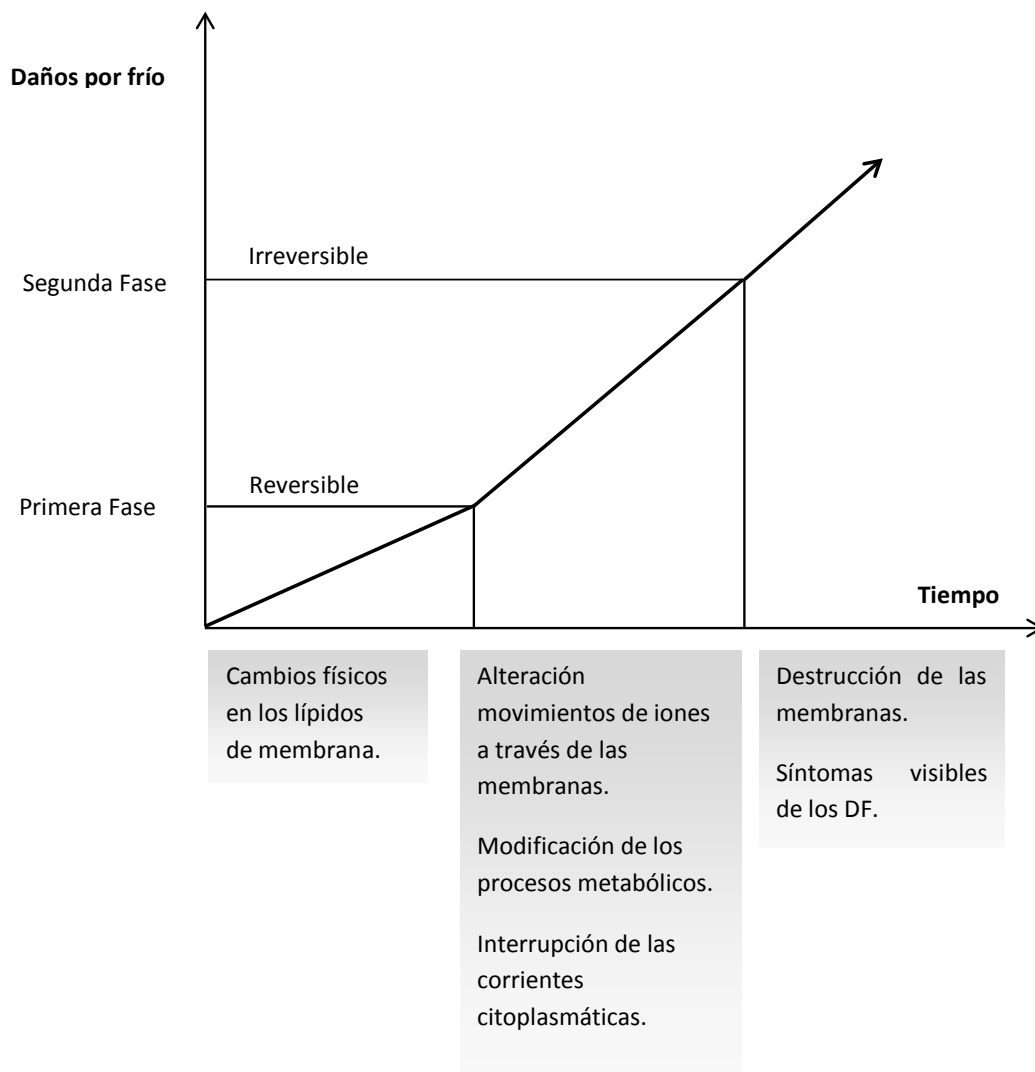


Figura 1.3.- Sucesión de eventos que conducen a los daños por frío. (Elaboración propia).

Aunque se han propuesto diversas teorías para explicar las causas que producen la sensibilidad al frío. En la actualidad se acepta que el primer evento de los daños por frío es el cambio en las propiedades físicas de las membranas celulares, debido a las modificaciones experimentadas por el estado físico de los lípidos de la membrana y se le conoce por hipótesis lipídica de la lesión por frío (Lyons, 1973; Whitaker, 1992; Marangoni *et al.*, 1996). Los daños por frío también pueden verse asociados a un estrés oxidativo relacionado con la disminución de la actividad de las enzimas que eliminan las especies de oxígeno activo como catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (Ju *et al.*, 1994; Sala, 1998).

En el modelo de los daños de los lípidos de membrana se producen cambios biofísicos y químicos que conducen a una cascada de reacciones bioquímicas que a su vez conlleva la muerte de la célula y el deterioro de los tejidos (Marangoni *et al.*, 1996). Debido a que estos eventos también suceden en tejidos maduros y senescentes (Lester 1993; Lacan 1996, 1998) se sugirió que la hormona de la maduración, el etileno, podía jugar un papel en el desencadenamiento de los daños por frío. Algunas investigaciones en frutos climatéricos y no climatéricos mostraron que los frutos eran más sensibles a los daños cuando eran tratados con etileno (Yuen *et al.*, 1995). Sin embargo se describió en algunos trabajos que tratamientos con etileno exógeno eran beneficiosos en la reducción de los daños por frío (Lipton y Ahroni, 1979). Además, algunos frutos como tomate y papaya exhibieron una disminución en la sensibilidad a esta fisiopatía cuando avanzaba el proceso de maduración y aumentaba la producción de etileno (Wang, 1993).

1.1.2.- Manifestaciones fisiológicas de los daños por frío

Uno de los efectos más llamativos de la bajada de temperatura sobre los tejidos vegetales es la disminución acusada de los movimientos citoplasmáticos o de ciclosis cuando la temperatura baja por debajo del umbral crítico. En las células resistentes por el contrario no se aprecia ninguna modificación. Wood *et al* (1984) encontró que los tricomas de peciolo de tomate presentan una disminución de los movimientos citoplasmáticos cuando se sometían a una temperatura de 10°C durante 1 ó 2 minutos y que este fenómeno se acentuaba a 5° ó 0°C. Después de una estancia prolongada en frío (24 horas a 0°C) los movimientos citoplasmáticos de las células de estos tricomas no se recuperan cuando se disponen a temperatura ambiente, contrariamente a lo que se observa en las células tolerantes al frío como las de la especie *Digital purpura*. La muy rápida aparición de este fenómeno tras la exposición de los tejidos vegetales a temperaturas inferiores al umbral crítico permitió suponer que podrían constituir el primer evento de la enfermedad de los daños por frío (Wood *et al.*, 1984).

Para que se produzcan estos movimientos es necesario el suministro de energía y dependen también de las propiedades físicas del citoplasma y del sistema de membranas

celulares. Se verificó que en los frutos sensibles el suministro de ATP baja sensiblemente y las lipoproteínas de la membrana experimentan una transición a un estado más rígido (fase gel), que en última instancia provoca el cese del movimiento de ciclosis (Lyons, 1973, Raison *et al.*, 1990).

Además de estos eventos citológicos, varios cambios ultraestructurales tienen lugar durante el desarrollo de los daños por frío. Se describieron múltiples y graves alteraciones en los orgánulos y membranas celulares de los vegetales sensibles al frío, que conducen la muerte de numerosas células como aumento y degeneración de las mitocondrias y de plastos, vacualización y dilatación del retículo endoplasmático, pérdida de ribosomas, ruptura de tonoplastos, aglutinación de la cromatina y depósito de materiales nuevos en la pared celular. (Ilker *et al.*, 1976). Es probable que estos cambios estructurales se produzcan a continuación de eventos más precoces y serían pues el resultado más bien que la causa de las desregulaciones observadas.

Otro efecto muy importante del frío sobre los frutos y hortalizas sensibles es la alteración de las membranas, y más específicamente un cambio de fase de los lípidos de la membrana y una modificación de la permeabilidad de la membrana (Lyons, 1973; Ruelland *et al.*, 2009). Lyons (1973) para explicar las perturbaciones causadas por el frío en los vegetales sensibles sugirió una teoría conocida como "teoría membranaria". Según esta teoría, las modificaciones de los lípidos membranarios constituyen el evento primario de los desórdenes debidos al frío. En efecto el frío provoca modificaciones de la organización molecular y estructural de la matriz lipídica de las membranas. Estos autores pensaron que el efecto inmediato de las bajas temperaturas era un aumento global de la microviscosidad de la matriz. Por debajo de una temperatura crítica denominada "temperatura de transición", este fenómeno induce una organización de los lípidos membranarios en estructura rígida, denominada sólido-gel. Cuando la duración de esta perturbación por el frío ha sido lo suficientemente prolongada, provoca una gran extensión de zonas rígidas en las membranas, lo que conduce a pérdidas de elasticidad, rupturas, y pérdidas de agua, iones y metabolitos.

La teoría membranaria presenta como eventos más significativos un aumento de la salida de electrolitos, (Autio *et al.*, 1986; King y Ludford, 1983), una transición de fase de los lípidos a la temperatura crítica (Mc Murdo y Wilson, 1980) y cambios en la composición de los lípidos. Estos últimos son similares a los que ocurren durante la senescencia del fruto, e incluyen peroxidación de lípidos, aumento del índice de saturación de los ácidos grasos, degradación de los fosfolípidos, y galactolípidos y aumento de la relación esteroides/fosfolípidos (ParKin *et al.*, 1989; Nguyen *et al.*, 1990; Whitaker, 1995; Sevillano *et al.*, 2009; Marangoni *et al.*, 1996). Como consecuencia se produce una disminución en la fluidez, disminución de la funcionalidad de la membrana y de las proteínas asociadas a ella, pérdida de turgor, salida de electrolitos, pérdida de la energía metabólica, desintegración del sistema fotosintético y finalmente la muerte de la célula.

En la Figura 1.4 se recoge un esquema de los eventos que tienen lugar en los tejidos vegetales sensibles al frío y que conducen a la fisiopatía de los daños por frío (Lyons, 1973).

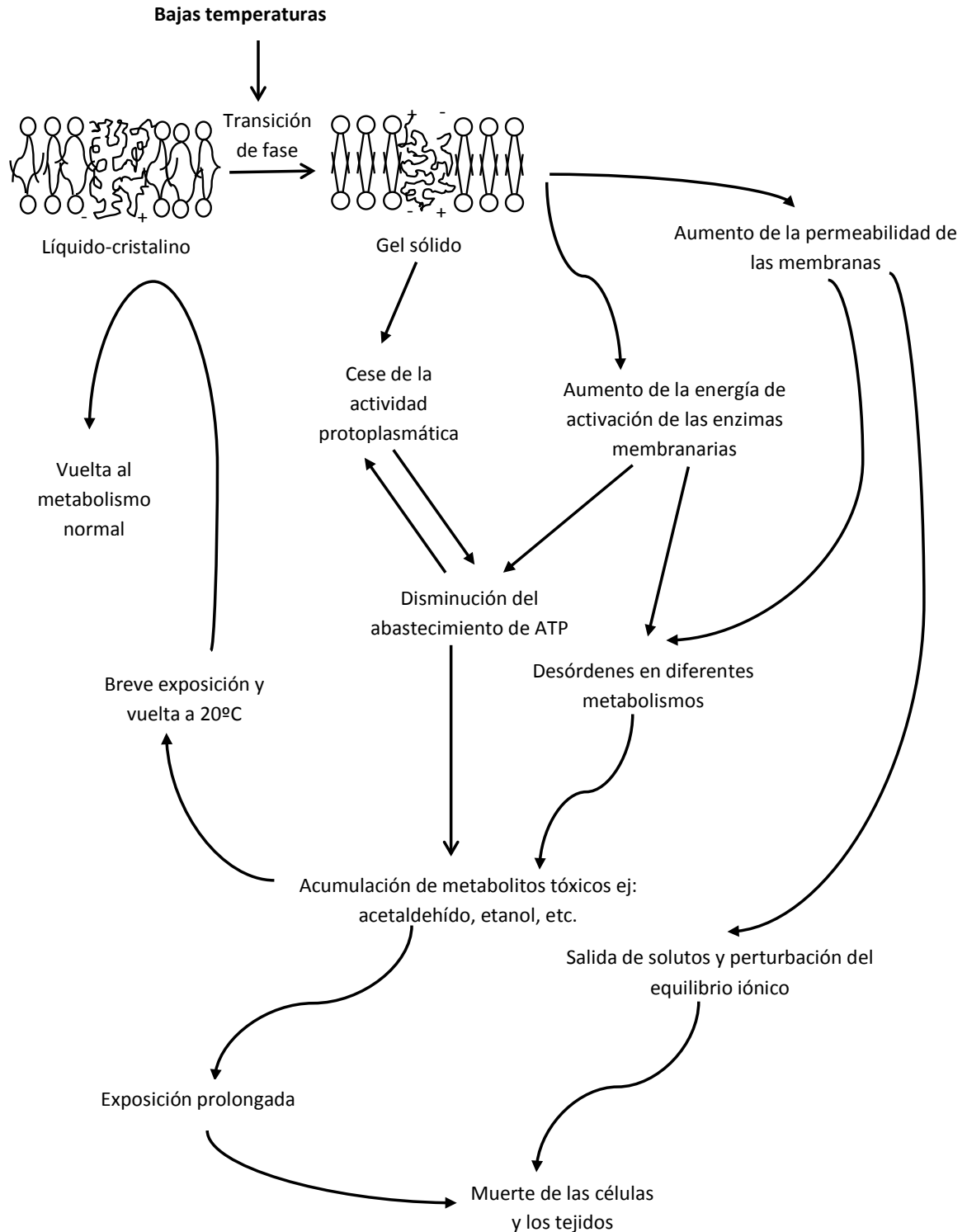


Figura 1.4.- Acontecimientos que conducen al desarrollo de los "daños por frío" en los frutos. (Lyons, 1973).

Es interesante resaltar la posible relación entre el cambio en la composición de los lípidos de la membrana mitocondrial y la pérdida de energía metabólica en las células afectadas por los daños por frío. En efecto las modificaciones causadas afectan también a la estructura y a la actividad de las enzimas ligadas a las membranas y en particular las que catalizan la respiración y la producción de etileno. Se puso de manifiesto (Kacperska, 1989) que las bajas temperaturas provocan una disminución de la respiración y del coeficiente respiratorio de los vegetales. En algunos casos, la bajada de la temperatura tiene tendencia, a alterar el correcto funcionamiento de los enzimas de la respiración y disminuyendo la síntesis de ATP a activar los procesos fermentativos y la acumulación de etanol y acetaldehído Shirra, 1992. Este fenómeno se explica por el hecho de que el frío disminuirá el nivel de las oxidaciones respiratorias y afectaría menos el de la glicolisis (Raison, 1980). De esta forma se favorecería la acumulación de compuestos procedentes de la fermentación, tóxicos para la célula. Esta hipótesis fue confirmada por Eaks (1980) y Schirra (1992) que encontraron un aumento de etanol y acetaldehído en plátano, aguacate y naranjas conservadas en frío y transferidas a temperatura ambiente. La producción de etileno también se vio afectada aumentando o disminuyendo según los casos, cuando se sometieron los frutos por debajo del umbral crítico de la tolerancia al frío (Wang, 1989).

1.1.3.- Papel de las hormonas en los daños por frío

1.1.3.1.-Efecto de las bajas temperaturas sobre la biosíntesis y la producción de etileno

La demostración que la vía de síntesis del etileno, a partir de la metionina, es activa en los tejidos sensibles al frío la puso de manifiesto Wang y Adams (1980) al encontrar que la L-[3,4-¹⁴C] metionina era transformada en ACC y posteriormente en etileno en tejidos de la corteza de pepino sometidos o no a baja temperatura. Estos resultados indican que la metionina es utilizada como precursor del etileno tanto en los tejidos dañados por el frío como en los que no se someten a baja temperatura. El etileno sintetizado bajo los efectos del frío se produce también por la vía del ACC, establecida por Adams y Yang (1979).

En algunas especies tropicales, como el tomate y la judía, los tratamientos por frío, inducen una ralentización considerable de la ACC oxidasa y una disminución acusada de la producción de etileno cuando se almacenaban a 11° o 12°C (Field, 1981). Resultados similares se pusieron de manifiesto en pimiento (Wang, 1982) y manzana (Mattoo y Lieberman, 1977). Por otro lado, la adición de ACC exógena a discos de hojas incubadas a 5°C induce un aumento de la producción de etileno, mientras que los discos de hoja incubados a la misma temperatura sin adición de ACC no sintetizaron cantidades suplementarias de ACC endógeno (Wang, 1989). Esto indica que durante la estancia en frío

la biosíntesis de etileno está reducida considerablemente, debido más por la inhibición de la síntesis de ACC que por la menor actividad de la ACC oxidasa.

Sin embargo, el efecto del frío solamente puede observarse, por lo general, tras haber puesto el fruto a temperatura ambiente. En efecto, en la mayoría de los casos, el tratamiento por el frío estimula de forma acusada la síntesis de etileno cuando vuelven a la temperatura de 20°C (Sevillano *et al.*, 2009). Este fenómeno se puso de manifiesto también en plantas que normalmente producen poco etileno (Cooper *et al.*, 1969; Eaks, 1980. Efersen y Kent 1982, 1983 analizaron los mecanismos de esta estimulación y demostraron que el aumento de ACC y de la producción de etileno tenían lugar muy rápidamente después de colocarlos a la temperatura ambiente. Por otro lado, Field (1981) encontró que las hojas de judía tratadas con 1 mM de AVG, inhibidor de la ACC sintetasa, al final de la permanencia en frío y posteriormente transferidas a 25°C, producían poco etileno, indicando que el ACC no se acumula durante el periodo de incubación a 5°C. Se puede deducir que el frío podría tener un papel en la iniciación de la cadena de biosíntesis del etileno, pero que las últimas etapas que conducen a su producción no son activas hasta después de pasar a temperatura ambiente.

Field (1981) propuso que las bajas temperaturas podrían inducir la formación de un factor asociado a la membrana citoplasmática y que sería responsable del desencadenamiento de la producción de etileno cuando se transfiera a 25°C. Sin embargo, numerosos estudios mostraron que la síntesis del ACC no se manifiesta durante la incubación a bajas temperaturas, poniéndose de manifiesto después de haber transferido el fruto a temperatura ambiente como en pepino, (Wang y Adams, 1980) y en tejido de hoja de judía (Field 1981).

Wang y Adams (1980) demostraron que la actividad ACC sintetasa aumenta rápidamente en los primeros minutos cuando se transfiere de 2,5° a 25°C y que el nivel de ACC aumenta 50 veces durante las 7 primeras horas de calentamiento tras un periodo de 4 días a 2,5°C. Resultados similares se obtuvieron en la pera "Passe crassane", que al transferirla de 0° a 18°C se induce un importante aumento de la actividad ACC sintetasa (Lelièvre *et al.*, 1997). La incorporación de la metionina marcada en ACC y etileno es mayor en los tejidos de pepino conservados a 2,5°C y posterior transferencia a temperatura ambiente que en los controles a 13°C (Wang y Adams, 1980). Estudios realizados con inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas en tejidos sometidos al frío han aportado algunos datos interesantes sobre los posibles mecanismos de la síntesis de etileno bajo las bajas temperaturas y posterior reacondicionamiento a temperatura ambiente. Wang y Adams (1980) y Wang (1993) encontraron que la actividad ACC sintetasa, los niveles de ACC y la producción de etileno en tejidos de pepino enfriados y posteriormente puestos a temperatura ambiente se inhiben por la cicloheximida (CHI) (inhibidor de la traducción); pero no se ven afectados por la α -amanitina (inhibidor de la transcripción). Estas experiencias indicaron que el tratamiento con frío estimula la síntesis

de transcritos de la ACC sintetasa y que la traducción del ARNm de la ACC sintetasa solo es posible cuando el fruto se dispone a temperatura ambiente.

Estos resultados muestran que los efectos del frío sobre la síntesis de etileno implican:

- una reducción de la actividad de ACC oxidasa sin ser limitante sobre la producción de etileno.
- un aumento de transcritos de ACC sintetasa, que conduce durante el calentamiento al aumento de la formación de proteína ACC sintetasa seguida de un incremento de ACC y posteriormente de etileno.

En la Figura 1.5. se recoge el esquema simplificado propuesto por Wang (1989) que muestra los posibles mecanismos de la acción del frío después del calentamiento.

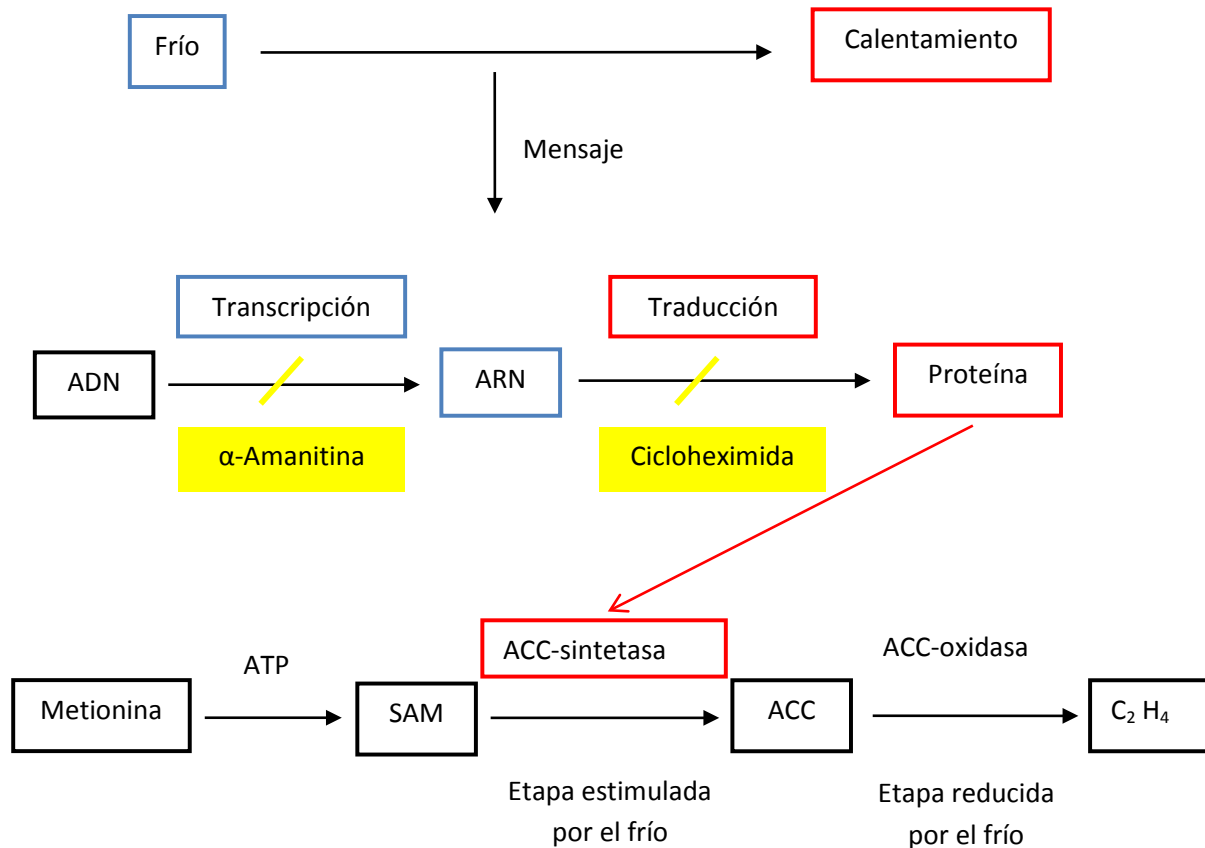


Figura 1.5.- Acción del frío sobre la síntesis del etileno tras el periodo de calentamiento. Wang (1989)

La utilización de inhibidores de la transcripción y traducción (Wang y Adams, 1980), indicó que la transcripción de ACC sintetasa tiene lugar durante el almacenamiento a baja temperatura y la traducción cuando el fruto es transferido a temperatura ambiente.

Tratamientos con propileno, análogo del etileno, y con antagonista del mismo como el 1-MCP a diferentes especies, apuntan a que la hormona de la maduración y senescencia juega un papel como inductor de los daños por frío, probablemente en combinación con las bajas temperaturas en algunas especies, mientras que en otras el etileno actúa como un inhibidor de la fisiopatía. Resultados obtenidos por Wong *et al* (1999) durante el almacenamiento de cítricos a baja temperatura confirman esta hipótesis, ya que observan un aumento de los niveles de ACC y etileno cuando los frutos se transfieren a temperatura ambiente después de haber estado en frío.

1.1.3.2.-Efecto del etileno sobre el desarrollo de los daños por frío

El papel que juega el etileno en el desarrollo de los daños por frío no ha podido aclararse a pesar de los numerosos trabajos realizados en los últimos años y sigue siendo motivo de controversia. Algunos autores consideran que el etileno tiene una acción protectora contra la aparición y desarrollo de la enfermedad, mientras que otros han encontrado que sería de hecho un estimulador.

Lipton y Ahroni (1979) vieron que el tratamiento de melón "Honey dew" con 1000 ppm de etileno a 20°C durante 24 horas antes del almacenamiento a 2,5°C redujo sobre un 75% los daños por frío. Los tratamientos con etileno en la desverdización del pomelo antes de la conservación en frío, tuvo un efecto protector (Grierson, 1974). Observaciones similares se encontraron en patata tratada con etileno después del periodo de frío (Buescher, 1977). Además, frutos como el tomate (Autio y Bramlage, 1986) y papaya (Wang, 1989) presentaron una disminución a la sensibilidad a los daños por frío cuando fueron recolectados en estados tardíos de madurez debido, tal vez, a una producción de etileno más importante.

Al contrario, otros estudios han puesto de manifiesto que en algunos frutos climatéricos y no climatéricos la sensibilidad a los daños por frío aumenta cuando son tratados con etileno. Se observó en aguacates tratados con etileno antes de su conservación a 6°C, que la aceleración en la maduración aumenta su sensibilidad al frío y que disminuye de forma considerable su vida comercial útil (Chaplin *et al.*, 1983). En un ensayo sobre este mismo fruto conservado a una temperatura inferior a 12°C en presencia de 100 ppm de etileno, desarrolló los síntomas de daños por frío muchos más acusados que los controles conservados a la misma temperatura y en aire (Lee y Young, 1984). Además se encontró que en aguacates recolectados en estado inmaduro desarrollan muchos menos síntomas que en los estados maduros y sobremaduros (Kosiyachinda y Yand, 1976). En el

caso de frutos no climatéricos, como la naranja y pomelo, se demostró que la utilización de etileno en la desverdización aumenta significativamente su sensibilidad a los daños por frío (Yuen *et al.*, 1995).

Ahora bien, el etileno producido durante la maduración de los frutos parece estar asociado a la sensibilidad a la enfermedad, aunque no se tiene claro si su acción es directa o indirecta. De acuerdo con la bibliografía, los cambios bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar durante la maduración, tales como la modificación de la estructura y modificación de la membrana celular, el aumento de la salida de electrolitos y la reducción de las actividades de las enzimas anti-oxidantes alcanzan los valores más importantes en los frutos sensibles a los daños por frío (Marangoni *et al.*, 1996). Durante la maduración, la membrana celular experimenta cambios que afectan a su conformación y a su estructura, lo que induce un aumento del grado de saturación y de la peroxidación de lípidos y de una parte de los fosfolípidos (Lyons, 1973; Whitaker, 1992; Marangoni *et al.*, 1996). Estos cambios producen una pérdida de la integridad membranaria observada también en el desarrollo de la senescencia y maduración de algunos vegetales (Droillard *et al.*, 1987; Paliyath y Droillard, 1992; Marangoni *et al.*, 1996), incluidos frutos como el melón (Lester y Stein, 1993; Lacan y Baccou, 1998) y el tomate (Autio y Bramlage, 1986). En el caso de numerosos órganos senescentes se encontró una gran producción de radicales libres (peróxidos, superóxidos etc.) y una débil capacidad de detoxificación de oxígeno activo (H_2O_2 , $O^{\cdot -}$) (Droillard *et al.*, 1987; Borochoy y Woodson, 1989; Paliyath y Droillard, 1992; Marangoni *et al.*, 1996).

Por otro lado, estudios fisiológicos y bioquímicos de órganos vegetales sensibles a la enfermedad mostraron que presentan una pérdida de la semi-permeabilidad membranaria (Lyons, 1973; Tatsumi y Murata, 1981; Whitaker, 1992; Marangoni *et al.*, 1996), una estimulación de las enzimas de peroxidación de lípidos, como las lipoxigenasas, asociado a una ralentización de las enzimas anti-oxidantes como catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasas (Hiriyadi y Parkin, 1991; Ju *et al.*, 1994; Sala, 1998). Además, las poliaminas que tienen una acción antagónica del etileno y la propiedad de retardar la senescencia al preservar la integridad de la membrana (Galston y K-Sawhney, 1987) están presentes en gran cantidad en los vegetales resistentes a la enfermedad del frío (Kramer y Wang, 1989).

El papel del etileno, junto con las bajas temperaturas se puso de manifiesto en experiencias realizadas en diversos frutos. Por ejemplo, el melón transgénico "Cantalupe charentais", que tiene inhibida la producción autocatalítica de etileno, presenta una aparente resistencia a los daños por frío, con un nivel bajo de desintegración de la membrana al ser bajo el porcentaje de salida de electrolitos. Esta característica también se observó en estos melones durante la maduración (Ben Amor *et al.*, 1999; Martínez-Madrid *et al.*, 2002). En melocotón, otra de las manifestaciones de los DF es la pérdida de jugo y ésta es más severa cuanto menor es la temperatura de conservación, sobre todo por

debajo de 7,5°C; y al mismo tiempo la producción de etileno disminuye considerablemente (Walsh *et al.*, 2002).

En un fruto no climatérico como la mandarina los DF en la piel están asociados a una inducción de la síntesis de etileno, sobre todo cuando los frutos son transferidos a 20°C. Para entender la regulación de la biosíntesis de etileno en la mandarina "Fortuna", Zacarias *et al.*, (2003) aislaron cDNAs que codifican para ACC oxidasa y ACC sintetasa y estudiaron su expresión durante diferentes condiciones de conservación. Los resultados indicaron que a baja temperatura y posterior almacenamiento a temperatura ambiente hay una inducción y acumulación de transcritos de ACS y ACO y que la temperatura también afecta al régimen de actividad de ambas enzimas. El melón "Piel de sapo", característico de nuestro país, es también no climatérico y sensible a los daños por frío por debajo de 8°C, en la variedad "Sancho" se encontró que la aplicación de etileno externo protege ligeramente el desarrollo de los DF en la piel, hasta los 20 días de conservación, y el tratamiento con 1-MCP no tiene efectos positivos (Valdenegro *et al.*, 2005).

Se estudió la relación entre el etileno y los DF en dos variedades de ciruela, una climatérica y otra no climatérica, bloqueando con 1-MCP y estimulando con etileno. Mientras que en la variedad climatérica los DF se aprecian a los 30 días de conservación, en la no climatérica se mantenía sin daños hasta el final de la experiencia. La incidencia de los DF en la variedad climatérica está claramente relacionada con un aumento inducido por el frío de la capacidad de producir etileno. La incidencia en la variedad climatérica es del mismo orden que en la no climatérica cuando la síntesis de etileno es bloqueado con 1-MCP, y al contrario la no climatérica tratada con etileno muestra una alta incidencia de desórdenes, lo que confirma que en ciruela los DF están relacionados con la pauta climatérica (Candan *et al.*, 2008).

Los kakis climatéricos son muy sensibles al etileno y su exposición a tratamientos exógenos acelera su natural ablandamiento a temperatura ambiente y agravan los DF en el almacenamiento a baja temperatura (Besada *et al.*, 2010).

1.1.3.3.-Interacción de otras hormonas con los daños por frío

La posible implicación de las poliaminas (PAs), reguladores del crecimiento de las plantas, en los mecanismos de defensa frente a diferentes tipos de estrés (Flores, 1990; Khmer *et al.*, 1997; Boucherean *et al.*, 1999) despertó el interés de investigar su comportamiento frente a los daños por frío. Las poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) se encuentran en altas concentraciones en los tejidos meristemáticos y activan el crecimiento de los tejidos en las plantas superiores.

La diamina Put se sintetiza en las plantas a partir de ornitina a través de dos vías: directamente, catalizada por la ornitina descarboxilasa e indirectamente a través de una serie de intermediarios. La Put es entonces convertida en Spd y Spm después de la adición de uno o dos grupos propilamino respectivamente a partir de S-adenosilmetionina descarboxilasa (dSAM) (Galston y Kaur-Sawney, 1987, 1990; Tiburcio *et al.*, 1993). S-adenosilmetionina es también el precursor de la biosíntesis de etileno, por lo que un aumento en PA, debido a la actividad d-SAM afectará al nivel de producción de etileno. Como la concentración de PAs es mucho mayor que las correspondientes a etileno y a su inmediato precursor el ácido-1-aminociclo-propano-1-carboxílico (ACC), cambios en la concentración de PAs afectará más a la biosíntesis de etileno y ACC que cualquier otra vía (Walden *et al.*, 1997).

Las poliaminas son un potente inhibidor de muchos procesos relacionados con la senescencia en una variada especies de plantas y, su actividad antisenescente está relacionada con la estabilidad o protección que confiere a las membranas, debido a su naturaleza policatiónica, siendo Spm (tetramina) más efectiva que Spd (triamina), y esta más que Put (diamina) (Galston *et al.*, 1987). Las poliaminas tienen también propiedades de captar radicales libres (Drolet *et al.*, 1986). Establecida la relación entre poliaminas y protección de las membranas y entre daños por frío y deterioro de las membranas, la posibilidad de encontrar una conexión entre poliaminas y la fisiopatía despertó un gran interés entre los investigadores.

Mc Donald y Kushad (1986) encontraron que en pimiento, limón y pomelo la aparición de daños por frío implicaba un aumento de Put. Además se puso de manifiesto que el incremento del contenido en PA como respuesta fisiológica al estrés por daño por frío es más acusada en las plantas tolerantes que en las sensibles (Guye *et al.*, 1986; Kramer y Wang, 1990; Lee, 1997). Aunque estos resultados parecen indicar, pero no probar, una implicación de las PAs en la inducción a la tolerancia de los daños por frío, pero la vía por la que estas moléculas estimulan esta tolerancia no se ha esclarecido de momento.

La acumulación de Put en plantas de tomate cuando se sometieron a bajas temperaturas, indujo a Kim *et al.*, (2002) a plantear la hipótesis de que esta poliamina podría jugar un papel como inductora a la tolerancia de los daños, ya que estas plantas experimentan una reducción del orden del 30% en la salida de electrolitos (Martínez-Tellez *et al.*, 2002). Cuando las plantas se trataron con un inhibidor de la biosíntesis de la Put, su contenido disminuye y el porcentaje de salida de electrolitos aumenta, siendo éste proporcional a la concentración aplicada (Kim *et al.*, 2002).

Los resultados de la bibliografía sugieren que el incremento de PAs en el fruto y en otras partes de la planta es una causa y no la consecuencia de la tolerancia que experimenta a los daños por frío, pudiéndose considerar, por lo tanto, una acción de

defensa de las plantas frente al frío más que un síntoma causado por él. Parece ser que el incremento endógeno de los niveles de poliaminas podría hacer a los tejidos menos susceptibles a los daños por frío.

El ácido abscísico (ABA) se encuentra en todas las plantas superiores y en todos los tejidos vegetales. Los niveles de ABA entre los diferentes órganos de la planta están ampliamente supeditados por las condiciones de estreses ambientales, incluidos la sequía y las bajas temperaturas. Su intervención en el caso de los daños por frío ha sido considerado hace algunos años. En principio el ABA puede tener un efecto positivo sobre la tolerancia de los daños por frío, ya que juega un papel importante en el control del cierre de estomas y por consiguiente en la velocidad de transpiración y el mantenimiento de la relación del agua en la célula. En calabacín se encontró un incremento del ABA durante el almacenamiento en frío (Wang *et al.*, 1994). Lafuente *et al.*, (1997) no observaron relación entre los cambios en ABA y el impacto en los daños por frío, durante la maduración, en la mandarina "Fortuna", muy sensible a los mismos. Por otro lado se encontró que tratamientos que incrementan los niveles endógenos de ABA hacen que aumenten los daños por frío (Gosalbes *et al.*, 2004).

La aplicación de ABA a hojas de tomate indujo un aumento significativo de la salida de electrolitos, el primer síntoma fisiológico de los daños por frío (Kim *et al.*, 2002). Estos autores encontraron así mismo una acumulación de putrescina causada por las bajas temperaturas. Tratamientos con esta poliamina y con un inhibidor de su síntesis mostraron que esta hormona también se encuentra involucrada en la tolerancia a las bajas temperaturas, como hemos indicado precedentemente. Es interesante destacar que dichos autores consideran que el papel del ABA es mucho más importante que el de la Put, ya que el incremento de la salida de electrolitos en las hojas de tomate, cuando se tratan con un inhibidor de la síntesis de Put está contrarrestado cuando son tratados con ABA.

Los mecanismos fisiológicos que hacen que el ABA reduzca el impacto de los daños por frío no se ha establecido completamente. La aplicación exógena de ABA fue utilizada para inducir el cierre de los estomas antes de someter el tejido a bajas temperaturas con objeto de evitar la pérdida de agua y los daños por frío (Rikin *et al.*, 1976; Christiansen *et al.*, 1978).

Como consecuencia del carácter lipofílico del ABA se sugirió que puede interaccionar o insertarse entre las colas hidrofóbicas de la estructura de la membrana celular, aumentando la temperatura de transición y por lo tanto su fluidez (Markhart, 1986).

1.1.4.- Acción de proteínas específicas en respuesta a las bajas temperaturas

Estas proteínas específicas se denominan “de choque térmico” debido a que se confirmó su síntesis como respuesta a temperaturas elevadas, aunque también se las denomina “proteína de estrés” porque otros agentes estresantes puede inducir su síntesis. (Ritossa, 1962; Sevillano *et al.*, 2009). Hoy día se conoce que todos los organismos tienen la capacidad de sintetizar este tipo de proteínas ante la incidencia de diversos factores estresantes (Parsell y Linnquist, 1993; Nover, 1991; Vieling, 1991).

Las proteínas de estrés (HSPs) engloban diversos tipos que se diferencian por su peso molecular, propiedades y estructura (Gusev *et al.*, 2002). Algunas HSPs son necesarias para el crecimiento en un rango normal de temperaturas y son constitutivas, otras ayudan a las células a resistir los efectos dañinos de ciertas condiciones extremas como las elevadas temperaturas, el estrés oxidativo, la presencia de compuestos orgánicos, metales pesados y otros factores considerados como estresantes. El efecto protector lo ejercen actuando como chaperonas moleculares, proteínas que ayudan a otras proteínas a mantener o a recuperar su conformación nativa, estabilizando estados parcialmente desnaturalizados.

Durante el estrés se induce la desnaturalización y disfunción de muchas proteínas, y es entonces cuando intervienen las HSPs ayudando a mantener el adecuado plegamiento y conformación de proteínas estructurales y funcionales (Vinocur *et al.*, 2005; Sánchez-Bel *et al.*, 2012). Bajo condiciones normales de crecimiento de los tejidos vegetativos la mayoría de las HSPs, por lo general, no se pueden detectar, pero se acumulan rápidamente en respuesta a un choque térmico. Se comprobó que su acumulación es proporcional a la temperatura y al periodo de tiempo que actúa el estrés (Water *et al.*, 1996) y en ocasiones está acompañada de la adquisición de la resistencia a los daños por frío (Rozenzweig *et al.*, 2004; Polenta *et al.*, 2007). También inducen la acumulación de HSPs, la maduración del fruto (Medina-Escobar *et al.*, 1998) y el estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2000).

Además de las altas temperaturas también se puso de manifiesto que tratamientos con algunos compuestos antes de las bajas temperaturas, como metil derivados del ácido jasmónico, un regulador del crecimiento de las plantas, y el ácido salicílico, induce la síntesis de HSPs y al mismo tiempo aumentan la tolerancia de los DF (Ding *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006).

1.1.5.- Control de los daños por frío

Los notables progresos que se han alcanzado en las dos últimas décadas permiten hoy día disponer de diversas tecnologías poscosecha para retardar o mitigar el desarrollo de los DF (Shewfelt, 1986) de las especies sensibles, o bien para aumentar su tolerancia (Wang, 2000).

A nivel industrial se utilizan, con mayor o menor éxito diversos sistemas que van desde tratamientos físicos, como atmósferas controladas o modificadas (Lan, 1989; Ahoroni *et al.*, 1993; Wang, 1993; Pesis *et al.*, 2000), acondicionamiento previo a temperaturas moderadas (Wang, 1995), tratamientos con CO₂ previo o durante la conservación frigorífica (Bertolini *et al.*, 1991; Escribano *et al.*, 1997), calentamiento intermitente mediante "golpes de calor" (Artés y Escribano, 1994), pretratamientos con altas temperaturas (Lurie y Klein, 1991) y pretratamientos con compuestos químicos.

1.1.5.1.-Tratamientos físicos

Hoy día se ha comprobado que la conservación en atmósferas con diferentes concentraciones de CO₂ y O₂ reducen apreciablemente la aparición de los DF, y que este efecto está más relacionado con los niveles de CO₂ que de O₂. Controlando la concentración de estos dos gases, se puede simultáneamente optimizar la conservación, y minimizar los DF, como se observó en diversos frutos, aguacate, y guayaba (Meir *et al.*, 1995; Singh y Pal, 2008).

Desde hace unos años se está utilizando una tecnología, denominada atmósfera modificada (AM), con resultados positivos y que en el fondo tiene el mismo principio que la atmósfera controlada (AC), ya que modifica la atmósfera que rodea al fruto mediante la utilización de bolsas de film plásticos de diferente permeabilidad en los que se introducen los frutos y tras un cierre hermético se procede a su almacenamiento a la temperatura adecuada. Esta técnica permite prolongar la vida comercial sin pérdidas apreciables de calidad (Kader *et al.*, 1989; Zagory *et al.*, 1988). La conservación en AM, además de generar una atmósfera rica en CO₂ y pobre en O₂, en el interior de la bolsa, reduce la tasa de respiración y la producción de etileno, retrasando la maduración y senescencia de frutos y hortalizas, y contribuye al mantenimiento en el entorno del fruto de un alto grado de humedad relativa (HR) que evita o retrasa la pérdida de agua de estos. (Kader *et al.*, 1989).

La atmósfera de equilibrio que se alcanza en el interior de la bolsa, con niveles altos de CO₂ y bajos de O₂, depende del metabolismo del fruto, de la permeabilidad del plástico y de la difusión gaseosa a través del film. En la actualidad son muy numerosas las investigaciones que se han realizado para evaluar la incidencia de esta técnica sobre la aparición y desarrollo de los daños por frío en frutas y hortalizas de interés comercial

(Hakim, 1997; Nguyen *et al.*, 2004; Pesis *et al.*, 2000). En melón "Cantaloupe charentais" que tiene inhibido la síntesis de etileno mediante la expresión de un gen antisentido de la ACC oxidasa se ha observado que a pesar de mostrar una resistencia acusada a los DF, no llega a ser total, mientras que cuando se conserva a 2°C y posterior acondicionamiento a 20°C en bolsas de un film de permeabilidad selectiva, los daños se inhiben prácticamente (Flores *et al.*, 2004).

En el caso de la utilización de films micro y macroperforados la AM en el interior de la bolsa difiere poco de la atmósfera normal y sin embargo también tuvo efectos sobre los DF, retrasando su aparición con respecto a los controles no empacados (Wang *et al.*, 1997; Meir *et al.*, 1997). En estas condiciones se explicó que la causa principal que evita el desarrollo de los daños por frío es la alta humedad relativa en el interior de la bolsa, que evita una excesiva pérdida de agua del fruto (Ben-Yehoshua, 1983). Sin embargo, cuando se utilizaron films macroperforados los resultados no fueron positivos, así utilizando polipropileno macroperforado se encontró que en melocotón "Paraguay" (Fernández-Trujillo *et al.*, 1998) y en naranja y pomelo no se inhibe el DF.

Otras tecnologías basadas en la modificación de atmósfera que rodea al fruto también se han desarrollado para limitar o evitar los DF. La aplicación durante un corto periodo de tiempo de altas concentraciones de CO₂ (choques) o muy bajas de O₂ (hipoxia severa) antes o durante la conservación a baja temperatura, suele reducir los DF y retrasar la senescencia de algunos cítricos, frutos de hueso, de pepita, en baya y hortalizas etc. aunque su aplicación industrial es todavía muy escasa (Marcellin y Ulrich, 1983; Artes, 1984; Kader, 1990). Los niveles muy bajos de O₂, del orden del 1%, limitan de forma acusada la tasa respiratoria y el metabolismo en general y de forma particular la biosíntesis de etileno, ya que es necesario para la acción de la ACC oxidasa en la conversión de ACC en etileno, facilitar el suministro de ATP en la activación inicial de la metionina y necesario para la unión del etileno con su receptor.

Tratamientos con niveles de O₂ inferiores al 1% antes de la conservación disminuyeron los DF en manzana (Blanpied, 1997) y en mandarina (Sala, 1998) debido tal vez a que la aparición de la fisiopatía está asociada al estrés oxidativo y es necesario que el fruto tenga un sistema antioxidante eficiente. Por otro lado, pretratamientos con niveles de CO₂ del 40% durante 3, 6 o 9 días redujeron la membranosis y el picado después de 30, 60, y 90 días a 0°C (Bertolini *et al.*, 1991). Con niveles muy elevados de CO₂ se puede correr el riesgo de que se induzca la fermentación anaerobia del fruto, modificando sustancialmente sus características aromáticas por la producción de acetaldehído y etanol (Lurie y Pesis 1992; O'Hare y Prasad, 1993).

1.1.5.2.-Tratamientos térmicos

La temperatura y el tiempo son las variables primarias que afectan al desarrollo de los DF. Para cualquier fruto, e incluso variedad, a cualquier temperatura, existe un tiempo mínimo de exposición para inducir un daño irreversible. Este tiempo puede variar desde pocas horas hasta varias semanas. Se observó que los DF son menores y que hay un aumento de la resistencia a la aparición de dichos daños, si el periodo de tiempo que están los frutos a bajas temperaturas se interrumpe, reduce o se suprime y el fruto continua su proceso normal de maduración (Covey, 1982).

La posibilidad de poder influir en los DF mediante el control de la temperatura indujo al desarrollo de una tecnología basada en pretratamientos a alta temperatura, que consiste en sumergir las frutas en agua caliente (HWD) o duchas calientes y cepillado (HWRB), vapor de agua y aire caliente (Lurie, 1998; Porat *et al.*, 2000; Fallik, 2004). El tiempo y temperatura del tratamiento depende de diversos factores, siendo los más importantes la especie, variedad, estado de maduración y las condiciones de cultivo. Es muy importante controlar estos y otros factores como la forma del fruto y el tamaño porque pueden afectar a la uniformidad del tratamiento, ya que el calentamiento del fruto se produce debido a un gradiente de temperatura desde la superficie al centro del fruto (Paull *et al.*, 2000). Las aplicaciones de estas técnicas a diferentes especies vegetales mostraron que las más adecuadas son la HWD y HWRB al no modificar los parámetros de calidad en comparación con otros tratamientos de duración más amplia (Porat *et al.*, 2000; Fallik, 2004).

Algunos autores han puesto en evidencia el efecto positivo de estos tratamientos en la reducción de los daños por frío en frutos, como mandarina (Sala *et al.*, 2000; Ghasemnezhad *et al.*, 2008; Schirra *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 2002), pomelo (Sapitnitskaya *et al.*, 2006; Porat *et al.*, 2000), granada (Mirdehghan *et al.*, 2007), tomate (Lurie *et al.*, 1997; Mc Donald *et al.*, 1999; Soto-Zamora *et al.*, 2005), mango (Mc Collum *et al.*, 1993), aguacate (Woolf *et al.*, 1995; Florissen *et al.*, 1996), pepino (Mao *et al.*, 2007) y pimienta (González *et al.*, 2000). Aunque no se tiene una justificación plena de la eficacia de estos tratamientos, se propusieron algunas teorías basadas en la inducción de la síntesis de proteínas HSPs que tiene lugar rápidamente como respuesta al tratamiento térmico, en el aumento del índice de desaturación de los lípidos de membrana, lo que induce a una mayor fluidez de las mismas y una menor pérdida de electrolitos (Lurie, 1998), en el aumento de los niveles de poliaminas (Mirdehghan *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2000; Wang, 1994) y en el incremento de la actividad antioxidante (Sala *et al.*, 2000, Ghasemnezhad *et al.*, 2008).

En los "tratamientos intermitentes" (IW) se someten los frutos a subidas de la temperatura mientras se encuentran sometidas a la conservación frigorífica. Este tratamiento debe realizarse durante la fase reversible de los DF y su aplicación presenta

ciertas dificultades ya que sus condiciones óptimas de temperatura, tiempo de alteración de la elevación de la temperatura y su frecuencia, depende de la especie, estado de madurez y condiciones de cultivo (Artés, 1995). Los mecanismos que hacen que se retrasen o eviten los DF no se han podido establecer, aunque algunos investigadores consideran que puede deberse a una producción de etileno que permite que los frutos maduren (Fernández-Trujillo *et al.*, 1997,1998).

El efecto positivo de los tratamientos de IW se ha aprovechado no sólo individualmente sino también combinados con otros tratamientos como 1-MCP, NO, el empleo de AM o el recubrimiento de cera con fungicidas, y se ensayaron en frutos tales como lima (Kluge *et al.*, 2003), melocotón (Zou *et al.* 2001; Mao y Zhang, 2001; Zhu *et al.*, 2010; Ben-Arie *et al.*, 1970; Fernández Trujillo y Artés, 2003), en granada (Artés *et al.*, 2000), naranja (Kluge *et al.*, 2007), o mandarina (Shivratan, 2011).

1.1.5.3.-Tratamientos químicos

Se han ensayado numerosos compuestos químicos para limitar los DF, si bien no todos presentan la misma eficacia. Dentro de los antioxidantes se han utilizado etoxiquinina, difenil amina, benzoato sódico y como fungicidas benzomilo, tiobendazol eimidazol. Sin embargo, la sensibilidad del consumidor frente a este tipo de sustancias, que suelen dejar residuos sobre la piel y son potencialmente nocivos para la salud ha motivado que se abandone su uso y se sustituyan por productos naturales.

El tratamiento con disoluciones de calcio en forma de nitratos, cloruro y sulfato, en el fruto antes o después de la recolección, hace que su concentración aumente en los tejidos, produciéndose incluso gradientes, y suele conferir una menor sensibilidad a los DF. Se ensayaron estos tratamientos, tanto solos como en combinación con otras sustancias (como ácido giberélico, boro, poliaminas, etc.) en muy diferentes frutos como piña (Hewajulige *et al.*, 2003; Wijeratnam *et al.*, 2006; Hewajulise *et al.*, 2006), mandarina "Fortuna" (DÁquino *et al.*, 2005), kaki (Besada *et al.*, 2008; Ferri *et al.*, 2008) y granada (Ramezianian *et al.*, 2010).

También se han realizado tratamientos con otras sustancias como ácido oxálico (Sayyari *et al.*, 2010), ácido abscísico (Chaiprasart *et al.*, 2002), y poliaminas. Aunque la mayoría de los trabajos con poliaminas se orientan a los efectos de los diversos tratamientos sobre los niveles endógenos de éstas y su relación con los DF, otros autores determinan la acción de la adición de poliaminas exógenas sobre el desarrollo de la fisopatía (Mirdehghan *et al.*, 2007).

Los recubrimientos céreos, ya sean de cera natural, escualeno, polietileno, siliconas y sucroésteres de ácidos grasos etc. parece que tienen un efecto protector a los DF, no por la acción directa del producto, sino porque pueden modificar, por un lado, la

composición de la atmósfera interna del fruto, con aumento de los niveles de CO₂ y etileno y disminución del O₂, y por otro, disminuir la pérdida de humedad del fruto. En melón Piel de Sapo, variedad "Sancho", la utilización de un recubrimiento a base de sucroésteres de ácidos grasos no tuvo ninguna incidencia sobre los DF cuando se conservaban a 2°C durante 40 días, aunque el desarrollo de fisiopatía aparecía después que en los controles. (Valdenegro *et al.*, 2005).

El óxido nítrico (NO) está presente en las plantas y participa, directa o indirectamente, en numerosos procesos fisiológicos tan importantes como la regulación del cierre estomático, la atenuación del estrés oxidativo producido por una alta concentración de sales, la movilización del hierro intracelular y participa tras las auxinas en la regulación de la arquitectura de la raíz. En las plantas existen dos vías principales de generación de NO, una es la biosintética y la otra es mediante la reducción de NO₂⁻ acumulado.

También se encontró que puede retardar la senescencia de los tejidos, existiendo una relación inversa entre etileno y NO. Se puso de manifiesto que un incremento en los niveles de NO en el fruto, ya sea mediante suministro exógeno o por una mayor producción endógena vía activación de las enzimas responsables de su síntesis, disminuirían la concentración de etileno y se retrasaría la aparición de síntomas relacionados con la senescencia, como la pérdida de textura, la degradación de clorofila, y la pérdida de proteínas y ácidos nucleicos (Leshemy Pinchasov, 2002; Leshem *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010). Yang *et al.*, (2011) encuentran que el NO aumenta la tolerancia a los daños por frío en pepino y que esta se debe a un incremento del sistema antioxidante. Y los resultados con mango han sido muy satisfactorios, ya que el NO disminuye significativamente los DF, reduce la respiración, la producción de etileno y la pérdida de textura, aumentando la vida comercial útil en la conservación frigorífica (Zaharah y Singh, 2011).

Otra de las estrategias sobre la que se ha centrado la atención en los tratamientos químicos ha sido la utilización de los ácidos salicílico (SA) y jasmónico (JA) o algunos de sus derivados. Estos compuestos podrían estar relacionados con el estrés oxidativo jugando un papel esencial en prever el daño oxidativo (Bowler *et al.*, 1994). Uno de los modos de acción propuestos para el JA es la inhibición de la catalasa, una de las enzimas eliminadoras de H₂O₂, de manera que las concentraciones celulares de H₂O₂ aumentarían y actuarían como mensajero secundario activando genes asociados a defensa (Chen *et al.*, 1993). El JA y su éster metílico (MeJA) se han encontrado de forma natural en un amplio rango de plantas superiores. El JA es el producto final de la oxidación enzimática de ácidos grasos insaturados, linoleico y linolénico principalmente, y la enzima clave de esta ruta es la lipoxigenasa (LOX) (Vick y Zimmerman, 1984). Son fitohormonas lipídicas que actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo. La volatilidad del

MeJA permite tratamientos gaseosos, mientras que el JA, al ser más soluble en agua, se utiliza en solución.

En ciruela en el tratamiento con SA los DF son inferiores a los controles, y los niveles de polifenol oxidasa (PPO), asociados al pardeamiento de la pulpa son también más bajos. Parece ser que los efectos positivos sobre los DF se deben a una menor salida de electrolitos, disminución del contenido de MDA, un retraso en la actividad de la PPO y a un aumento de poliaminas (Luo *et al.*, 2011). Por otro lado, la inmersión de piña en solución de ácido salicílico al 3 y 5 mM reduce el pardeamiento interno y disminuyen las actividades peroxidasa (POD), polifenol oxidasa (PPO) y fenilalanina amonio liasa (PAL), pero por el contrario se observa un incremento de superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX). La concentración superior es la más adecuada para retrasar la aparición del pardeamiento interno y prolongar la vida comercial útil (Lu *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011).

La combinación del MeJA y aire caliente en melocotón, sobre todo cuando se trata primero con este compuesto, posteriormente con aire caliente a 38°C durante 24 horas y finalmente con MeJA, reduce significativamente los daños por frío y mantiene las características representativas de la calidad, mientras que en el tratamiento con aire caliente no ocurre lo mismo. La vitamina C y fenoles totales mantienen sus niveles más altos que los controles, así como las actividades PAL, SOD y poligalacturonas (PG). Por el contrario las actividades polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) disminuyen (Peng *et al.*, 2009).

El estudio de la incidencia del MeJA sobre los DF y su relación con las modificaciones de la pared celular ha sugerido que el efecto positivo se debe a la inhibición de la acumulación de lignina y a un aumento de la solubilización de los polisacáridos de la pared celular (Cao *et al.*, 2010). Estos mismos autores han sugerido que el MeJA puede regular el metabolismo del ascorbato y glutatión y tiene un papel importante en la atenuación del daño oxidativo y en el aumento de la resistencia a los DF (Cai *et al.*, 2011).

Para inhibir la acción del etileno, en general, se puede actuar sobre las actividades de las enzimas implicadas en su biosíntesis, como la ACS y la ACO, o sobre el receptor del mismo **Figura 1.6.**

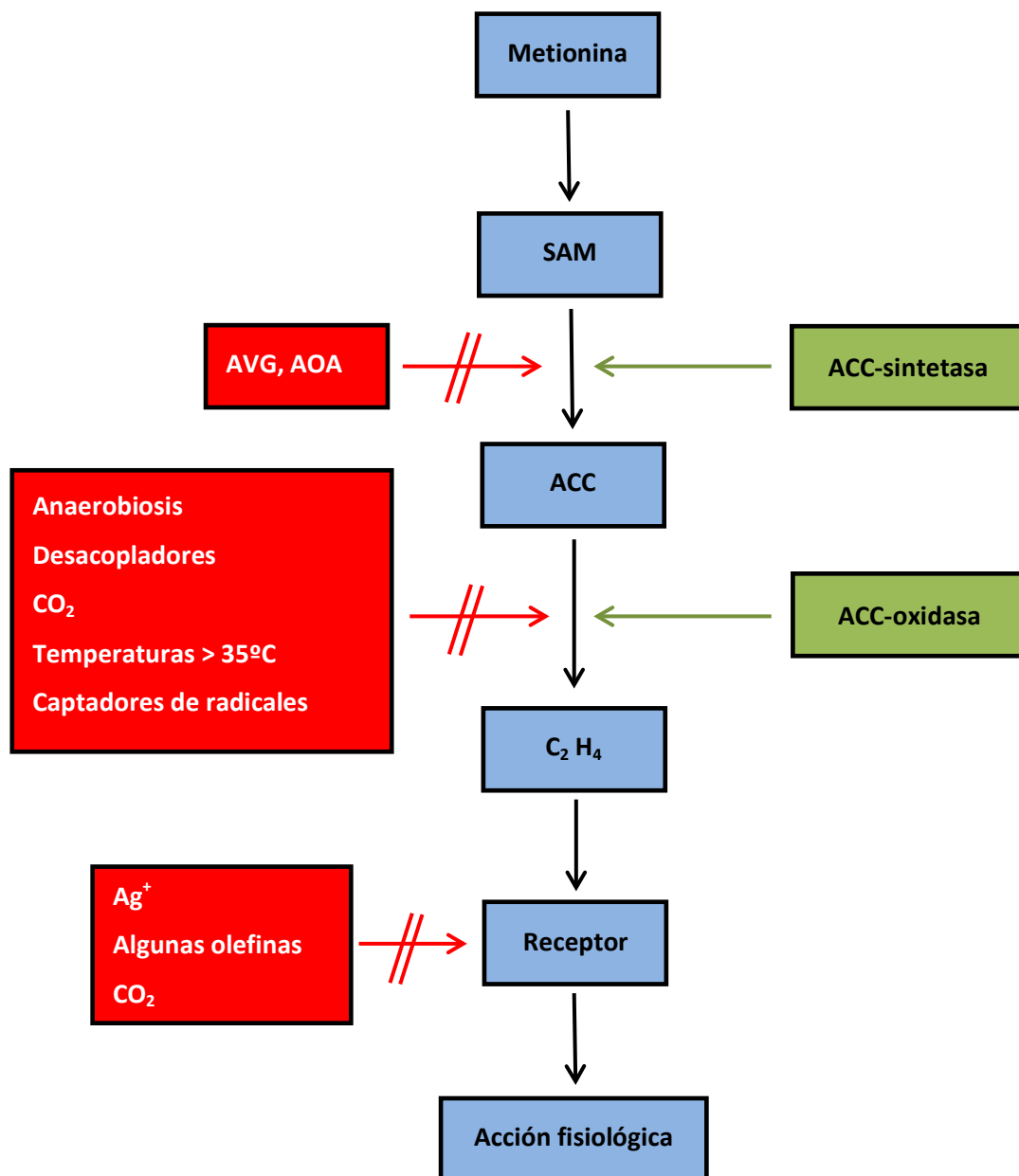


Figura 1.6. Esquema de la ruta de biosíntesis del etileno, agentes bloqueantes de la síntesis o acción del etileno y los posibles sitios de actuación de los mismos. AVG (Ácido aminoetoxivinilglicina), AOA(Ácido aminooxicético). Egea 2006.

Sisler y Serek (1997) encontraron, compuestos orgánicos muy eficaces para el bloqueo del receptor de etileno, algunos de ellos incluso insensibilizan los tejidos hacia el etileno durante 10 o 12 días, actuando a concentraciones tan bajas como 0,5 nL/L, proporcionando nuevas posibilidades para el control de la maduración y senescencia así como otras respuestas de la planta hacia el etileno.

Sisler y Pian (1973), observaron que algunas olefinas cíclicas como el 2,5-norbornadieno (2,5-NBD) se unían al receptor del etileno y en vez de inducir en la planta

la respuesta al etileno la bloqueaban. Estos compuestos sin embargo, requerían de una exposición continua para ser efectivos. Otros compuestos tales como el cis-buteno y ciclopenteno (Sisler y Yang, 1984), entre otros heterociclos, mostraron también capacidad para inhibir la acción de la hormona de la maduración. Más adelante, en 1990, se observó que los trans-ciclooctenos con una tensión de anillo alta, pero no los cis-ciclooctenos con menor tensión de anillo (Figura 1.7), fueron más efectivos en términos de concentración que el 2,5-NBD (Sisler *et al.*, 1990). Sin embargo, todos estos compuestos al igual que el 2,5-NBD requieren una exposición continua, una alta concentración, poseen un fuerte olor y en general son potencialmente cancerígenos (Sisler, 1991).

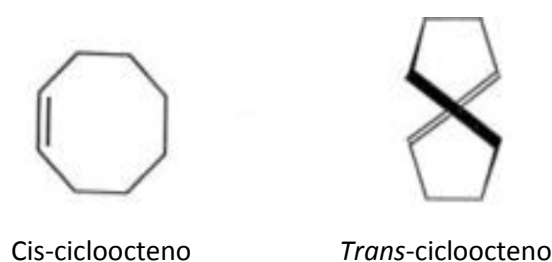


Figura 1.7. Estructura del cis-cicloocteno y trans-cicloocteno. Ambos compuestos bloquean el receptor del etileno, pero el trans-cicloocteno, con un impedimento estérico alto, es 650 veces más activo, en cuanto a concentración se refiere que la forma cis.

El diazociclopentadieno (DACP) (Figura 1.8) es otro inhibidor de la respuesta del etileno pero muy débil, sin embargo, sometido a irradiación con luz visible da lugar a uno o más compuestos activos que bloquean la respuesta al etileno durante más de 12 días, con una única exposición y con actividad hasta 5000 veces superior que el DACP. Estos compuestos fotolíticos no obstante, son muy inestables y no se han podido identificar. Además, el mayor problema del DACP es que es explosivo a altas concentraciones, suponiendo esto un importante factor limitante para su éxito comercial (Sisler y Blankenship, 1993 a, b).

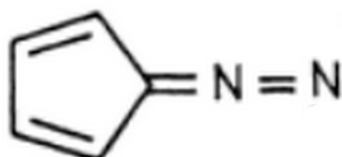


Figura 1.8. Estructura química del DACP

Posteriormente se descubrió que algunos ciclopropenos también contrarrestaban la acción del etileno durante 10 ó 12 días con una sola exposición al químico y a

concentraciones muy bajas (0,5 nL/L) (Sisler *et al.*, 1996 a, b). Entre ellos, el ciclopropeno (CP), el 1-metilciclopropeno (1-MCP) y el 3,3-dimetilciclopropeno (3,3-DMCP) son todos agentes activos, pero el CP y 1-MCP son cerca de 1000 veces más activos que el 3,3-DMCP. El 1-MCP (Figura 1.9) es el compuesto más activo y que tiene las mayores prestaciones entre los agentes inhibidores encontrados hasta el momento, en base a las concentraciones aplicadas y a su estabilidad, además no presenta olor y no tiene propiedades tóxicas. El 1-MCP a temperatura ambiente y presión atmosférica es un gas inerte, su peso molecular es 54 y su fórmula C_4H_6 (Sisler y Blakenship, 1996).

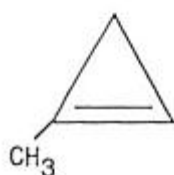


Figura 1.9. Estructura química del 1-MCP

El 1-MCP compite cinéticamente con el etileno antes de unirse al receptor, después de la unión no se ha demostrado competición porque el receptor permanece inactivo por mucho tiempo. La afinidad del 1-MCP por el receptor es aproximadamente 10 veces mayor que la del etileno, y además es activo a mucha menos concentración. El 1-MCP puede influir también en la biosíntesis del etileno en algunas especies a través de la inhibición por retroalimentación (Blankenship y Dole, 2003). Se observó que durante la maduración de frutas tratadas con 1-MCP, incluso la exposición a grandes cantidades de etileno (1000 $\mu\text{L/L}$) no genera respuesta en los tejidos. Esto es debido a que los agentes bloqueantes "permanentes" como el 1-MCP y el producto fotolítico del DACP se disocian del receptor muy lentamente y, mientras estos compuestos permanecen unidos al mismo, el etileno no puede competir por el receptor y por tanto no produce efecto en el fruto. Sin embargo, tras 12 días a 25°C los tejidos vuelven a ser sensibles al etileno, de lo que se deduce que en este tiempo se da alguna disociación entre el agente y el receptor, aunque también podría deberse a la generación de nuevos receptores en el tejido durante dicho tiempo. De hecho, la diferencia entre los agentes bloqueantes que tienen que ser expuestos continuamente para ejercer su efecto y los que solo necesitan una sola exposición, parece estar relacionada precisamente con el tiempo de disociación del químico y el receptor del etileno (Tabla III) (Sisler y Serek, 1999).

Tabla III.- Tiempo requerido para que la mitad de los receptores vuelvan a ser libres después de la exposición al compuesto. En el caso del 1-MCP y del 3,3-DMCP, el tiempo se refiere al tiempo necesario para que las bananas vuelvan a ser sensibles al etileno después de una única exposición, mientras que en el resto de compuestos la exposición es continua (Sisler y Serek, 1999).

Compuesto	Vegetal tratado	Tiempo (min)
Etileno	Brote de haba	10
Etileno	Hojas de tabaco	10
Etileno	Hojas de tomate	2
2,5-NBD	Brote de haba	180
Trans-cicloocteno	Brote de haba	360
3,3-DMCP	Banana	25200
1-MCP	Banana	43200

Se realizaron numerosos ensayos de tratamientos con 1-MCP en diversos frutos durante su conservación a bajas temperaturas, con objeto de investigar la participación del etileno en los DF y de mejorar y alargar la vida comercial del fruto. Los resultados fueron contradictorios, ya que mientras unos eran prometedores otros eran todo lo contrario. Se observó una reducción del pardeamiento interno de la piña, así como un retraso en la pérdida de parámetros relativos a la calidad, cuando era tratada con 1-MCP, lo que parece indicar la participación del etileno en el desorden fisiológico (Selvarajah *et al.*, 2001). En melón "Cantaloupe" se obtuvieron resultados similares cuando fueron tratados con el inhibidor de la síntesis del etileno, mostrando que en este caso también parece implicado en el proceso del desarrollo de la fisiopatía. (Ben Amor *et al.*, 1999). Por el contrario en el melón español Piel de Sapo variedad "Sancho", tanto los tratamientos con etileno y 1-MCP protegieron ligeramente contra los DF. (Valdenegro *et al.*, 2005). En melón Galia aplicaciones de 1-MCP superiores a 300 nL/L redujeron significativamente los DF (Gal *et al.*, 2006). En el caso del aguacate se observó una reducción de los síntomas internos de los DF como es la decoloración del mesocarpo (Pesis *et al.*, 2002), pero no en los síntomas externos como el pardeamiento de la piel (Woolf *et al.*, 2005). La combinación del tratamiento con 1-MCP y bajos niveles de oxígeno fue significativamente positiva en aguacate, siendo los DF, respiración, evolución del etileno, malonildialdehido (MDA) y la actividad de la peroxidasa inferiores a los controles (Prabath *et al.*, 2011).

En cítricos, mientras ensayos en naranja, fueron desalentadores (Porat *et al.*, 1999), en otras variedades como "Hamlin" y "Valencia" y en pomelo "Marsh", la

aplicación de 1-MCP a concentraciones de 50 a 500 µg/litro confiere la mejor protección contra los DF y contra el desarrollo del picado en la posrecolección. En mandarinas “Nova” y “Ortanique”, el 1-MCP redujo significativamente los DF, pero al contrario que en otros frutos aumentó la producción de etileno, lo que pareció indicar que juega un papel importante en el desarrollo de los DF en los cítricos (Salvador *et al.*, 2006).

En frutos como el kaki almacenado a 1°C el tratamiento previo con 1-MCP redujo algunos de los síntomas característicos de los DF, así disminuía sensiblemente la pérdida de textura, pero no evitaba la aparición de puntos negros en la piel, considerándose una acción parcial sobre la fisiopatía (Krammer *et al.*, 2006). La combinación de 1-MCP con atmósfera modificada redujo algunos síntomas de los DF, como la pérdida de textura, pero no se evitaba la aparición de daños en la piel, aunque era más liviana que cuando se conservaban solo con 1-MCP (Argenta *et al.*, 2009).

En cultivares climatéricos de ciruela (Candan *et al.*, 2006), que al contrario de los no climatéricos son sensibles a los DF, se observó una reducción significativa de los DF cuando los frutos fueron tratados con este antagonista del etileno. En la variedad de ciruela “Larry Ann” el tratamiento con 1-MCP inhibió la producción de etileno, y la acumulación de ACC en frío, pero no la de MACC. Tampoco el tratamiento indujo el estrés oxidativo. Los resultados de esta variedad indicaron también que MACC y la actividad ACC-maloniltransferasa, fueron la clave reguladora del control de la maduración y del etileno y se relacionaron con desórdenes como los DF (Larrigaudiere *et al.*, 2009). La variedad de la ciruela y la pauta de maduración determinan la acción del 1-MCP, sobre el desarrollo de los DF, ya que en los climatéricos se aprecia una disminución de la translucidez de la pulpa, mientras que en los no climatéricos no se detecta una mejora, en los síntomas (Candan *et al.*, 2011).

En una variedad climatérica de guayaba también se observó una menor pérdida de la calidad y una mejoría significativa de los DF cuando fue tratada con 1-MCP frente a los controles. La acción sobre la producción de etileno y la tasa respiratoria también fue relevante ya que se redujeron de forma muy significativa (Singh y Pal 2008). En el caso de la nectarina “Fantasía” los tratamientos con 1-MCP retrasaron la evolución de la maduración cuando fueron conservados a 0°C durante 2 y 4 semanas, y la apreciación visual de los DF fue menor, sin embargo la pulpa mostró síntomas de endurecimiento, por lo que se necesitan más estudios para ver los otros efectos de 1-MCP (De Eil *et al.*, 2008).

Los efectos del 1-MCP sobre la reducción de los DF en níspero parece ser que se deben en primer lugar a una inhibición de la acumulación de lignina, al inhibirse la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), a una relación mayor entre la poligalacturonasa/pectinmetilesterasa y a un aumento de la solubilización de las pectinas en la pared celular (Cao *et al.*, 2010). También se ha encontrado que lipoxigenasa (LOX) y fosfolipasa (PLC) están asociadas a la inducción de los DF, y que la inhibición que

experimentan cuando los frutos son tratados con 1-MCP da lugar a la reducción de la fisiopatía (Cao *et al.*, 2009). El aumento de los niveles de linoleico y linolénico, una mayor ratio entre los ácidos grasos insaturados/saturados, y una modificación de los polisacáridos de la pared celular producidos por el 1-MCP en níspero reduce los DF (Cao *et al.*, 2009).

La manzana "Granny Smith" es muy susceptible a los DF, que se manifiesta por el escaldado superficial de la piel y que como en otros frutos podría deberse a un incremento de la producción de aniones superóxido, los cuales son responsables de la generación de otras especies de oxígeno peligrosas, los radicales libres de oxígeno (ROS). Tanto el tratamiento, antes del almacenaje, con baja concentración de O₂, como el 1-MCP, fueron efectivos para reducir el escaldado superficial tras 24 semanas a bajas temperaturas. Se ha comprobado que en los frutos tratados se expresan genes responsables de secuestradores de ROS, como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), mientras que los genes que expresan la polifenol oxidasa, asociada a los daños son más altos en los frutos controles (Sabban-Amin *et al.*, 2011).

El tratamiento con 1-MCP en melocotón reduce los DF y mantiene la calidad del fruto durante la conservación a baja temperatura. Inhibe la actividad de polifenol oxidasa y peroxidasa y mantiene altos los niveles de la actividad de las enzimas antioxidantes, y mantiene el ratio poligalacturonasa (PG)/pectinmetilesterasa (PME) (Peng *et al.*, 2011).

1.1.5.4.-Tratamientos con radiación ultravioleta de onda corta

En estos últimos años se ha desarrollado un método alternativo para el control de podredumbre y de otras alteraciones en la posrecolección y se basa en la aplicación de radiación ultravioleta de onda corta (UV-C), cuya longitud de onda se encuentra entre 283-200 nm. Dado que este tratamiento es fitotóxico es necesario optimizar la dosis y las condiciones de irradiación. Se realizaron pruebas con diversos cítricos (kumquat, naranja, pomelo) y pimiento, poniéndose de manifiesto una disminución de la podredumbre y de los DF. (Ben-Yehoshua, 2003).

En melocotón se encontraron resultados satisfactorios irradiando con UV-C durante 3, 5 y 10 minutos, pero a partir de esta última dosis los frutos presentaron pardeamiento en la piel. En condiciones adecuadas las características químicas no se vieron afectadas. Se detectó en todas las dosis un aumento de la producción de etileno y poliaminas, que aparentemente, estas últimas, aumentan la resistencia de los tejidos a los DF. (González-Aguilar *et al.*, 2004). Por otro lado, la irradiación de pimientos en estado rojo y conservados durante 15 y 22 días a 0°C más 4 días a 20°C, tuvo un efecto muy positivo sobre el control de los DF, presentando una menor salida de electrolitos, tasa respiratoria y contenido en fenoles (Vicente *et al.*, 2005). También se ha ensayado con frutos tropicales como mango (González-Aguilar *et al.*, 2007) y plátano (Pongpraser *et al.*, 2011). En ambos casos se ha comprobado que la UV-C permite prolongar la vida comercial y

reduce el impacto de los DF. En general los resultados encontrados, hasta el momento parecen indicar que este tipo de tratamiento podría ser interesante para reducir los DF y mantener la calidad de los frutos.

1.2.-MODIFICACIONES DEL ESTADO OXIDATIVO DE LOS FRUTOS ASOCIADOS A LOS DAÑOS POR FRÍO

1.2.1.- Estrés oxidativo

Además del efecto directo de las bajas temperaturas sobre la organización molecular de los lípidos de membrana, la pérdida de la integridad de la membrana está de por sí activada por los procesos oxidativos, ya que el estrés de las bajas temperaturas aumenta los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies moleculares son responsables de algunas de las alteraciones causadas por las bajas temperaturas en las plantas (Scandalio, 1993).

El estrés oxidativo también está asociado inicialmente a la presencia de otros tipos de estrés, como el hídrico (Li *et al.*, 1998), salinidad (Gosset *et al.*, 1994), exposición al ozono (Conklin y Last, 1995) y la radiación ultravioleta (Hideg *et al.*, 1997). Se demostró que el estrés oxidativo influye en el metabolismo del vegetal, como en señales en la célula, donde las especies activas de oxígeno funcionan como mensajeros primarios y secundarios involucrados en las respuestas de transducción de la señal de estrés (Price *et al.*, 1994). Las frutas y hortalizas frescas pueden sufrir distintos tipos de estrés durante el procesado, conservación y/o transporte, por ello ha aumentado el interés del estudio de estos cambios y como el estrés oxidativo está asociado con la calidad durante la poscosecha (Hodges *et al.*, 2004).

Una especie o sustancia oxidante es aquella capaz de aceptar electrones, de modo que va a provocar un desequilibrio en el número de electrones de las moléculas próximas a ella. Como radical libre se define cualquier especie química capaz de mantener una existencia independiente (de ahí el término "libre") con uno o más electrones no apareados en el orbital más externo de su estructura. Esta peculiaridad química los hace altamente reactivos, con una vida media muy corta y constituye la base de su posible toxicidad. Para estabilizarse tienden a captar los electrones que le faltan para completar su orbital molecular de moléculas vecinas, mediante reacciones de óxido-reducción, ocasionando que la estructura afectada quede inestable (Figura 1.10). De esta forma se pueden establecer reacciones en cadena en las que cada molécula implicada se convierte

a su vez en reactiva (con electrones desapareados) y tiende a conseguir su estabilidad interaccionando con otra molécula (Halliwell, 1995).

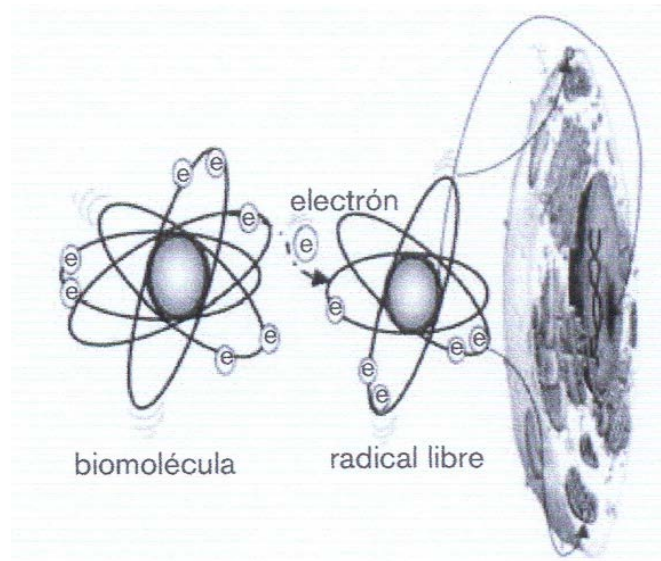


Figura 1.10.- Interacción de radicales libres con biomoléculas. Egea, 2006

Hay un amplio número de radicales libres o especies reactivas de oxígeno generados en los sistemas vivos. A continuación se describen algunos de los más frecuentemente detectados.

Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$): Este radical se forma cuando la molécula de oxígeno capta un electrón $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$. Tiene lugar en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por el oxígeno. Hasta hace poco tiempo, se creía que los radicales libres superóxido eran tóxicos per se. El $O_2^{\cdot-}$ puede actuar como agente oxidante o como reductor, y por tanto puede producir alteraciones en gran número de moléculas de importancia biológica. Se postuló la intervención directa del radical $O_2^{\cdot-}$ en determinados procesos degradativos, entre los que se incluyen peroxidación de lípidos, despolimerización de polisacáridos, liberación del hierro de la ferritina y ruptura y degradación del ADN. Sin embargo, posteriormente se demostró la limitada reactividad química del radical $O_2^{\cdot-}$ en medios acuosos, donde actúa primordialmente como agente reductor (Halliwell y Gutteridge, 1989; Ferradini, 1986). En realidad, su verdadera peligrosidad es indirecta y radica en su capacidad para llevar a cabo la lisis reductora del peróxido de hidrógeno, dando lugar a la producción de radicales hidroxilo (Czapski *et al.*, 1983; Puppo y Halliwell, 1988 a, b).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Hasta hace relativamente poco tiempo, el H_2O_2 ha sido considerado como un metabolito celular tóxico. Sin embargo, posteriormente se estableció que cumple una función importante como molécula señal tanto en plantas

como en animales. El H_2O_2 cumple una función importante frente a patógenos ya que por un lado, actúa directamente contra ellos, y por otro actúa como molécula señal en la inducción de genes de defensa (Mehdy *et al.*, 1996). El H_2O_2 también está implicado en la aclimatación a condiciones de estrés abiótico (Prasad *et al.*, 1994).

Radical hidroxilo (OH^\bullet): El OH^\bullet es uno de los oxidantes más poderosos que se conocen y es altamente tóxico, particularmente por lo que se refiere a las membranas biológicas, enzimas y ácidos nucleicos (Elstner, 1987).

Singlete de oxígeno (1O_2): La molécula de O_2 es un dirradical, es decir, tiene dos electrones libres o desapareados. Estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interactuar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Ésta es la razón por la cual el O_2 no es muy reactivo. El oxígeno en singlete (1O_2) se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando esto sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre (Egea, 2006).

Radical perhidroxilo (HO_2^\bullet): La forma protonada del $O_2^{\bullet-}$, el radical perhidroxilo (HO_2^\bullet), es un radical mucho más reactivo que el $O_2^{\bullet-}$ en soluciones acuosas. A pH fisiológico se encuentra a bajas concentraciones. No obstante, en un medio apolar, como el interior de las membranas, su formación puede estar favorecida, así como en aquellos compartimentos celulares en los cuales el pH sea ácido (Fridovich, 1983).

Radical peroxilo (ROO^\bullet): Está íntimamente relacionado con el proceso de autooxidación de lípidos, por el cual se producen reacciones en cadena en las que van apareciendo y desapareciendo distintos radicales libres (Halliwell *et al.*, 1995).

1.2.1.1.-Mecanismos bioquímicos responsables del estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando la generación de especies activas de oxígeno sobrepasa a la capacidad del vegetal para mantener la homeostasis del potencial redox, o más simplemente, cuando la producción de especies reactivas de oxígeno sobrepasa la capacidad de la planta para capturarlas. (Hodges *et al.*, 2004; Toivonen, 2004). Es importante señalar que el fenómeno del estrés oxidativo puede detectarse, tanto en frutas como en hortalizas de forma directa, como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, aumento de la peroxidación lipídica, aumento de la permeabilidad de la membrana o acumulación de pigmentos marrón por pardeamiento enzimático, o indirecta como cambios en los niveles de componentes de actividad antioxidante o en los sistemas enzimáticos antioxidantes (Toivonen, 2004).

La **Tabla IV** resume la dinámica de las respuestas al estrés, que puede ser dividida en tres fases o estados, la respuesta inicial es de alarma (Estado I) y lidera la producción de ROS. Como consecuencia de esto, se inician un sin número de modificaciones en el

metabolismo celular, incluyendo el aumento de la protección de los sistemas antioxidantes y la regulación genética, para efectuar estos cambios metabólicos y para aliviar la respuesta al estrés (Estado II). Sin embargo, si el estrés continúa o el nivel de éste es extremo, el sistema es sobrepasado y puede ocurrir daño celular y subcelular (Estado III). La regulación oxidativa, es un balance dinámico de procesos entre los sistemas que producen especies reactivas de oxígeno y aquellos que trabajan para capturarlas y contrarrestar el daño de las primeras (Toivonen, 2004).

Tabla IV.- Estados de respuesta del tejido frente a un estrés oxidativo y ejemplos de indicadores de la progresión en estados desde una respuesta inicial, intentos de hacer frente, y hasta el colapso celular. Esta tabla fue desarrollada bajo el concepto original de Lesham y Kuiper (1996) y completada por Toivonen, 2004.

Estado	Estado fisiológico	Ejemplos de mediciones indicativas del estado
I	Reacción de alarma	Explosión oxidativa, producción creciente de los aniones de superóxido, creciente producción de peróxido de hidrógeno.
II	Resistencia o aclimatación	Modificación de la expresión de genes, aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes, aumento de antioxidantes no enzimáticos, producción de las proteínas del choque del calor
III	Colapso o agotamiento	Daño en DNA/RNA, aumento de la peroxidación lipídica, pérdida de actividades enzimáticas antioxidantes, pérdida de antioxidantes no enzimáticos, aumento de la permeabilidad de la membrana, síntomas visibles de lesión

La formación en condiciones normales de cierta tasa de radicales libres en las células, es un proceso normal e inevitable que no causa daño oxidativo en las células, ya que éstas se protegen mediante una serie de mecanismos endógenos antioxidantes de defensa. El daño o estrés oxidativo se genera como consecuencia de la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminarlos, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento elevado de la producción de radicales libres.

Toivonen (2004) propuso un modelo que representa el comportamiento en condiciones normales de producción de ROS y como la célula puede reaccionar frente a una condición de estrés de diversa magnitud. La **Figura 1.11** muestra la producción de un cierto nivel de ROS, cuya acumulación es seguida y regulada por varios sensores y receptores en la célula. En una situación de estrés leve o sin estrés, la regulación de los niveles de ROS puede efectuarse mediante pequeños cambios en los sistemas de captación de ROS y por pequeños ajustes en el metabolismo. En una situación de estrés moderado aumenta la presión en el sistema, lo que se representa por flechas rojas en el modelo.

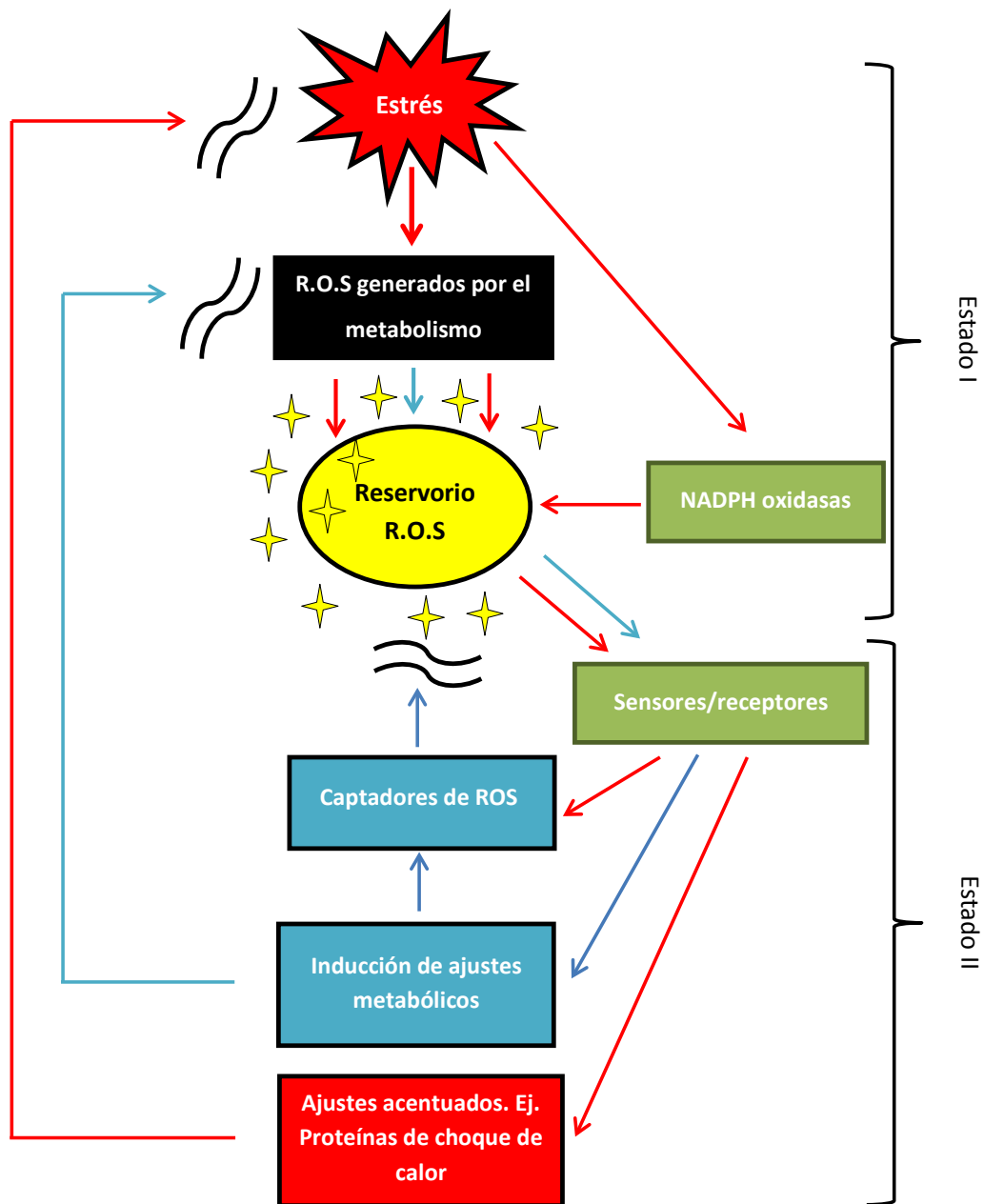


Figura 1.11.- Modelo de predicción que asocia las respuestas frente al estrés y la protección de los componentes antioxidantes en una célula vegetal (Toivonen, 2004)

1.2.1.2.-Efecto del estrés oxidativo sobre las células.

A pesar de que los ROS tienen una función fisiológica en los organismos vivos, si se permite la acumulación excesiva de estas especies, pueden ocasionar daños oxidativos en el ADN, proteínas y lípidos de membrana, acontecimientos íntimamente relacionados con los procesos de envejecimiento de los tejidos y la aparición de ciertas enfermedades (Halliwell, 1996).

Oxidación de estructuras lipídicas: De las estructuras susceptibles de sufrir oxidación los substratos más frecuentes son los ácidos grasos no saturados. Cuando éstos están libres se oxidan por lo general, más rápidamente, pero es fundamentalmente el grado de insaturación el factor que determina la mayor o menor susceptibilidad del ácido graso a sufrir oxidación. Los ácidos grasos polinsaturados se oxidan más que los saturados y los monoinsaturados, debido a que los metilenos entre un doble enlace pueden perder fácilmente un hidrógeno. La principal especie reactiva que puede robar estos hidrógenos es el radical OH^\bullet . Las membranas celulares contienen fosfolípidos que poseen ácidos grasos con varios dobles enlaces, por lo que en el organismo las membranas son unas de las estructuras más afectadas por la oxidación (Quaglia *et al.*, 1998). Este proceso es de tipo radical (autocatalítico) y después de iniciarse, se propaga mediante reacción en cadena. Esta serie de transformaciones en cadena originan una pérdida de fluidez, un aumento de la permeabilidad inespecífica a los iones e inactiva las enzimas ligadas a la membrana, obteniendo como resultado la pérdida de estructura de la bicapa lipídica y finalmente la lisis celular (Kunimoto *et al.*, 1981).

Oxidación de ácidos nucleicos y nucleótidos: La presencia de especies reactivas de oxígeno puede causar deleciones o modificaciones de las bases de la molécula de ADN, pudiendo tener este efecto una gran repercusión debido a la importancia biológica de los ácidos nucleicos. Al contrario que los lípidos, parece existir una muy baja posibilidad del establecimiento de reacciones en cadena, sin embargo, el daño puede ser más significativo, aunque sea limitado en extensión y localización (Velázquez *et al.*, 2004).

Oxidación de proteínas: La susceptibilidad de las proteínas a la oxidación depende de los aminoácidos que la componen y de la localización e importancia de los aminoácidos susceptibles en la configuración de la proteína, aunque el daño final puede en parte contrarrestarse por la posibilidad de reparación de las lesiones. Las proteínas que contienen los aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína, son especialmente sensibles a la agresión oxidativa, así como todas las moléculas con enlaces insaturados y que contienen sulfuros. La mayoría de los daños oxidativos en las proteínas son ocasionados por el radical OH^\bullet (Sevillano *et al.*, 2009).

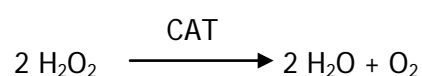
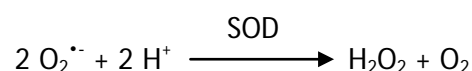
1.2.2.-Mecanismos antioxidantes de defensa.

El organismo posee una serie de mecanismos de defensa con carácter antioxidante, cuya misión es la de combatir las alteraciones oxidativas, intentando minimizar de esta manera, las alteraciones y lesiones celulares. Estos mecanismos actúan con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante desplazado a favor de estos últimos. El término antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con el sustrato oxidable, inhibe o retrasa de un modo significativo la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1989). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, debido a que estos reaccionan o interactúan más rápidamente con los ROS que el resto de moléculas presentes, en un determinado ambiente: membrana plasmática (vitamina E, carotenoides), citosol (SOD, CAT, PX, vitamina C), núcleo o líquido extracelular (vitamina E, vitamina C). La acción del antioxidante es en sacrificio de su propia integridad para evitar alteraciones en otras moléculas: lípidos, proteínas, ADN, etc. funcionalmente vitales o más importantes (Reitter, 1995). Dicho sistema antioxidante se puede clasificar en dos grandes grupos: enzimático y no enzimático.

1.2.2.1.-Sistemas enzimáticos

Los sistemas de defensa enzimáticos están constituidos principalmente por enzimas antioxidantes que actúan convirtiendo los ROS en otras especies más estables. Sus actividades están estrechamente relacionadas y requieren la presencia de otras enzimas y sustratos para su correcto funcionamiento. Por ejemplo, en un proceso habitual en la célula, la superóxido dismutasa (SOD), elimina el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), transformándolo en peróxido de hidrógeno, también oxidante, el cual será eliminado posteriormente por acción de la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPX).

La SOD es una metaloenzima, que elimina el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produciendo O_2 y H_2O_2 (Mittler, 2002). La CAT es también una metaloenzima, y es la encargada de completar el proceso de eliminación del $O_2^{\cdot-}$, catalizando la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Mittler, 2002):



La GPX es una metaloenzima que tiene como función principal la eliminación del H₂O₂, y para desempeñar su función, requiere la presencia de glutatión reducido (GSH), un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina, con un grupo sulfidhirilo (-SH). El glutatión reducido es utilizado como donador de un átomo de hidrógeno (electrón) y el radical tiilo que se forma se estabiliza reaccionando con otro radical tiilo formando disulfuro de glutatión o glutatión oxidado (GSSG).

La reducción del GSSG por acción de la enzima glutatión reductasa (GR) regenera el GSH. En esta reducción se invierte una molécula de NADPH, que se regenera por la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de la vía de las pentosas fosfato (Mittler, 2002).

1.2.2.2.-Sistemas no enzimáticos

Los sistemas no enzimáticos comprenden un amplio grupo de sustancias con carácter antioxidante, que pueden actuar como captadores de radicales o como quelantes de iones metálicos. Dentro de los sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos podemos discernir además entre los antioxidantes exógenos, los cuales se incorporan al organismo a través de la dieta, ya que no pueden ser sintetizados por éste (vitamina C, vitamina E, carotenoides y compuestos fenólicos); y los antioxidantes endógenos, que son sustancias generadas o sintetizadas por el propio organismo. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos endógenos se incluyen algunos antioxidantes detectables en el plasma como el ácido úrico, la albúmina, el glutatión, bilirrubina, algunas proteínas plasmáticas capaces de unir metales; otros constituyentes no proteicos, como el ubiquinol o coenzima Q; así como la melatonina y los estrógenos (Rice-Evans y Miller, 1997; Venereo, 2002).

Existe además una serie de micronutrientes con capacidad antioxidante, como es el caso del selenio, cuya actividad antioxidante se debe a la regulación de la enzima GPX que es selenio-dependiente. El selenio actúa además de forma sinérgica con la vitamina E evitando la oxidación lipídica. Otros micronutrientes como el zinc, manganeso y cobre ejercen también, aunque en menor medida, una actividad protectora contra la oxidación, ya que son necesarios para el correcto funcionamiento de las metaloenzimas antioxidantes anteriormente mencionadas (Aruoma, 1996).

Los alimentos que se caracterizan por poseer una mayor concentración de nutrientes antioxidantes, son los alimentos de origen vegetal. Así, numerosos estudios científicos, han concluido que dietas ricas en vegetales, frutas, hierbas aromáticas y especias, proporcionan al organismo numerosas sustancias fitoquímicas activas, tales como el ácido ascórbico, α y β -carotenos, antocianos, α -tocoferol, compuestos polifenólicos e incluso fibra (Bloch y Thomson, 1995; Plumb *et al.*, 1996; Craig, 1997).

La elevada actividad antioxidante de estos compuestos se debe fundamentalmente a que poseen una potente capacidad reductora, oxidándose ellos preferentemente en presencia de sustancias oxidantes y protegiendo de esta manera, las estructuras celulares. Los productos oxidados de estas sustancias son más estables y por tanto menos reactivos que las sustancias oxidantes originales.

1.2.2.2.1.-Ácido ascórbico

Estructuralmente, el ácido L-ascórbico (ASC) es una de las vitaminas más simples, siendo químicamente la aldona-1,4-lactona del ácido L-galactónico o L-gulónico. (Figura 1.12).

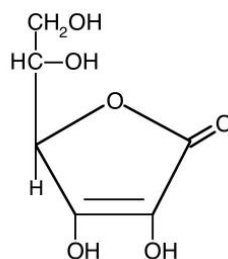


Figura 1.12.- Estructura química del ácido L-ascórbico

El ASC se oxida fácilmente, sobre todo en presencia de trazas de cobre y de hierro y de álcali. El primer producto de la oxidación del ASC es el ácido monodehidroascórbico (MDHA), también conocido como semidehidroascorbato, o radical anión ascorbilo (Cadenas, 1995; Larson, 1995). Este se puede oxidar espontáneamente y de forma reversible hasta ácido dehidroascórbico (DHA), el cual es inestable y se oxida, esta vez irreversiblemente, hasta ácido 2,3-dicetogulónico (Washko *et al.*, 1992; Deutsch, 1998).

El ASC en los sistemas vegetales, interactúa enzimática y no enzimáticamente con los radicales libres perjudiciales y especies reactivas de oxígeno. Estas reacciones de eliminación de ROS se pueden considerar como parte integral de los mecanismos naturales requeridos para la existencia aerobia de las células eucarióticas y las altas concentraciones intracelulares del ASC, son una indicación de la importancia de sus funciones en los organismos eucarióticos. En plantas, la capacidad del ASC para interactuar con los ROS generados fisiológicamente, implica al ASC en la modulación de procesos tales como la lignificación, la división celular y la respuesta hipersensitiva. La importancia biológica del carácter antioxidante del ASC es diferente al de otros antioxidantes de bajo peso molecular (α -tocoferol, ácido úrico, carotenoides, flavonoides, etc), ya que el ASC es capaz de terminar las reacciones en cadena de radicales, dando lugar a productos no tóxicos, no-radicales, como el DHA y el ácido 2,3-dicetogulónico. Una de las características más importantes de la actividad antioxidante del ASC, es su

implicación en la regeneración del radical lipofílico derivado del α -tocoferol asociado a la membrana (radical tocoferilo) (Davey *et al.*, 2000). Es capaz de captar especies reactivas de oxígeno tales como el radical $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , H_2O_2 , y el altamente reactivo radical OH^{\cdot} (Halliwell, 1996)

En general, las frutas suelen tener el mayor contenido de ASC, siendo especialmente ricas la grosella negra (200 mg/100 g PF), el kiwi (90 mg/100 g PF) la fresa (60 mg/100 g PF), y los cítricos (30 ± 50 mg/100 g PF). Pero no todas las frutas contienen tales niveles, así, las manzanas, las peras, y la ciruela representan solamente una fuente muy modesta de ASC (3 ± 5 mg/100 g PF).

Las verduras muestran un contenido muy variable de ASC, siendo las del género *Brassica* (coles de Bruselas, coliflor y col) las que contienen generalmente los niveles más altos, de 50 mg a más de 100 mg/100 g PF. Otras fuentes significativas de ASC, incluyen los guisantes, las habas verdes y los vegetales de hoja tales como la espinaca (50 ± 100 mg/100 g PF). Los pimientos (120 mg/100 g PF) y las calabazas (185 mg/100 g PF), son también alimentos ricos en ASC, sin embargo, las cebollas, las zanahorias y los cultivos de raíces, tienen niveles generalmente mucho más bajos.

1.2.2.2.2.-Carotenoides

El término carotenoides engloba un grupo de colorantes liposolubles estructuralmente relacionados, que se encuentran principalmente en plantas, algas y varios organismos inferiores. Actualmente, se han identificado más de 600 carotenoides diferentes, siendo el β -caroteno el miembro más prominente de este grupo (Van den Berg *et al.*, 2000).

La actividad antioxidante que muestran todos los carotenoides se debe fundamentalmente a su extenso sistema de dobles enlaces conjugados, los cuales proporcionan a estas moléculas un rico sistema de electrones el cual es susceptible de reaccionar con compuestos electrofílicos. Estas reacciones son las responsables de la inestabilidad de los carotenoides frente a la oxidación, y en presencia de oxígeno tienden a autooxidarse, en un proceso que ha sido descrito como "blanqueamiento". La reacción de los carotenoides con los agentes oxidantes o radicales libres, depende de la longitud de la cadena del polieno y de la naturaleza de los grupos finales (Palozza y Krinsky, 1992; Sies y Krinsky, 1995)

1.2.2.2.3.-Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, con una gran variedad de estructuras y de funciones, aunque

generalmente presentan un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, como elemento común a sus estructuras. Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas (se conocen más de 8000), la mayor parte de ellos tiene un origen metabólico común, la ruta del ácido siquímico, y el metabolismo de los fenilpropanoides (Robards *et al.*, 1999). Esta ruta conduce a la formación de varios compuestos fenólicos, tales como los ácidos fenólico o hidroxibenzoatos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanos y ligninas.

Los ácidos fenólicos se pueden diferenciar en dos grupos principales, los ácidos benzoicos (C_6-C_1 o C_6-C_2), y los ácidos cinámicos (C_6-C_3) y ambos derivados del ácido hidroxicinámico.

Los flavonoides ($C_6-C_3-C_6$) constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Se conocen unos 4000 flavonoides diferentes, distribuidos en varias subfamilias, como las antocianidinas y los taninos hidrolizables. Las antocianidinas son importantes pigmentos naturales, que contribuyen a la coloración de numerosas frutas. En los vegetales frescos generalmente se encuentran unidas a azúcares, dando lugar a los antocianos o antocianinas, que son responsables de los colores azules, púrpuras, rojos y matices intermedios de estas coloraciones (Clifford, 2000 b). Los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), los cuales contribuyen a la astringencia de los alimentos vegetales y las reacciones de pardeamiento enzimático (García-Alonso, 2002).

En las plantas los compuestos fenólicos se presentan conjugados con uno más residuos de azúcar, unidos a los grupos hidroxilo, aunque en ocasiones las uniones son directas entre el azúcar y un carbono del anillo aromático. Estas uniones los hacen solubles en agua y disolventes orgánicos. (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos se encuentran ubicados en el reino vegetal, pudiendo aparecer, potencialmente, en cualquier parte de la planta (fruto, raíz, hojas, madera). (Craig, 1997; Robards *et al.*, 1999). No son esenciales para la supervivencia de la planta, pero, desempeñan numerosas funciones defensivas en las plantas, de modo que factores ambientales como la luz, humedad, temperatura y factores internos como la genética, nutrientes, hormonas, etc. contribuyen a su síntesis.

Entre las numerosas propiedades químicas y biológicas que poseen los compuestos fenólicos cabe destacar su capacidad antioxidante, habilidad para inhibir la nitrosación, capacidad para quelatar iones metálicos y capacidad para modular ciertas actividades enzimáticas (Robards *et al.*, 1999).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura química, por lo que existen grandes diferencias entre los distintos grupos de compuestos.

1.3.- CALABACÍN

1.3.1.- Origen

El calabacín posee un origen incierto, ya que no se sabe con seguridad si procede de Asia meridional o de América central. Si se sabe que es una planta cultivada en todas las regiones cálidas de la Tierra desde tiempo inmemorial. Existen pruebas que esta hortaliza era ya consumida por los egipcios y, más tarde, por griegos y romanos. Sin embargo fueron los árabes quienes extendieron su cultivo por las regiones mediterráneas, donde se convirtió en un alimento de consumo habitual en la Edad Media, mientras que en las zonas del norte de Europa su consumo fue mucho más tardío y no tuvo lugar hasta después de la II Guerra Mundial.

1.3.2.- Taxonomía y morfología

El calabacín (*Cucurbita pepo* spp.*pepo*), pertenece al género *Cucurbita* y está compuesto por unas veintidós especies salvajes y cinco especies cultivadas (Decker, 1988). Estas especies son *C.pepo*, *C.moschata*, *C.maxima*, *C.ficifolia* y *C.argyrosperma*, siendo las tres primeras las más ampliamente distribuidas y más importantes desde el punto de vista comercial. *Cucurbita* es un género caracterizado por sus grandes hojas palmeadas, flores amarillo-anaranjadas productoras de néctar, polinizadas por abejas y por sus frutos grandes, duros, esféricos e indehiscentes.

C.pepo es la especie cultivada con mayor importancia económica del género *Cucurbita*, así como la más polifórmica. Este polimorfismo se manifiesta especialmente en sus frutos (tamaño, forma, coloración, textura etc.), aunque también en sus características vegetativas (hábito de crecimiento, longitud y grosor de los entrenudos, tamaño de las hojas etc).

Actualmente se cree que han existido dos domesticaciones independientes de *C.pepo*, una en México y otra en el este de Estados Unidos. Esta idea es apoyada por hallazgos arqueológicos, que ponen de manifiesto la domesticación desde hace más de 4.000 años en tres zonas del Norte de América bastante alejadas unas de otras, el sureste y noreste de México y el este de USA (Paris, 2001). Estas domesticaciones dieron lugar a dos linajes, que actualmente se clasifican en dos subespecies *C.pepo* spp.*pepo* y *C.pepo* spp.*ovifera*, la primera fue domesticada a partir de un ancestro desconocido hace unos 10.000 años en México, mientras que la segunda se cree que proviene de una

domesticación posterior (hace unos 500 años) en el este de Estados Unidos a partir de una especie salvaje *C. pepo ssp. ovifera* variedad ozarcana.

Existen ocho variedades botánicas o morfotipos comestibles diferentes de *C. pepo*, clasificadas en función de la morfología de sus frutos (Paris, 1989) y por análisis de marcadores moleculares (Paris *et al.*, 2003). Estas ocho variedades son: Pumpkin, Vegetable Marrow, Cocozelle y Zucchini, pertenecientes a *C. pepo ssp. pepo* y Scallop, Acorn, Crookneck y Straightneck de la subespecie *ovifera* (Figura 1.13).

A los cuatro primeros pertenecen los calabacines comestibles y las cuatro segundas tienen un destino ornamental.

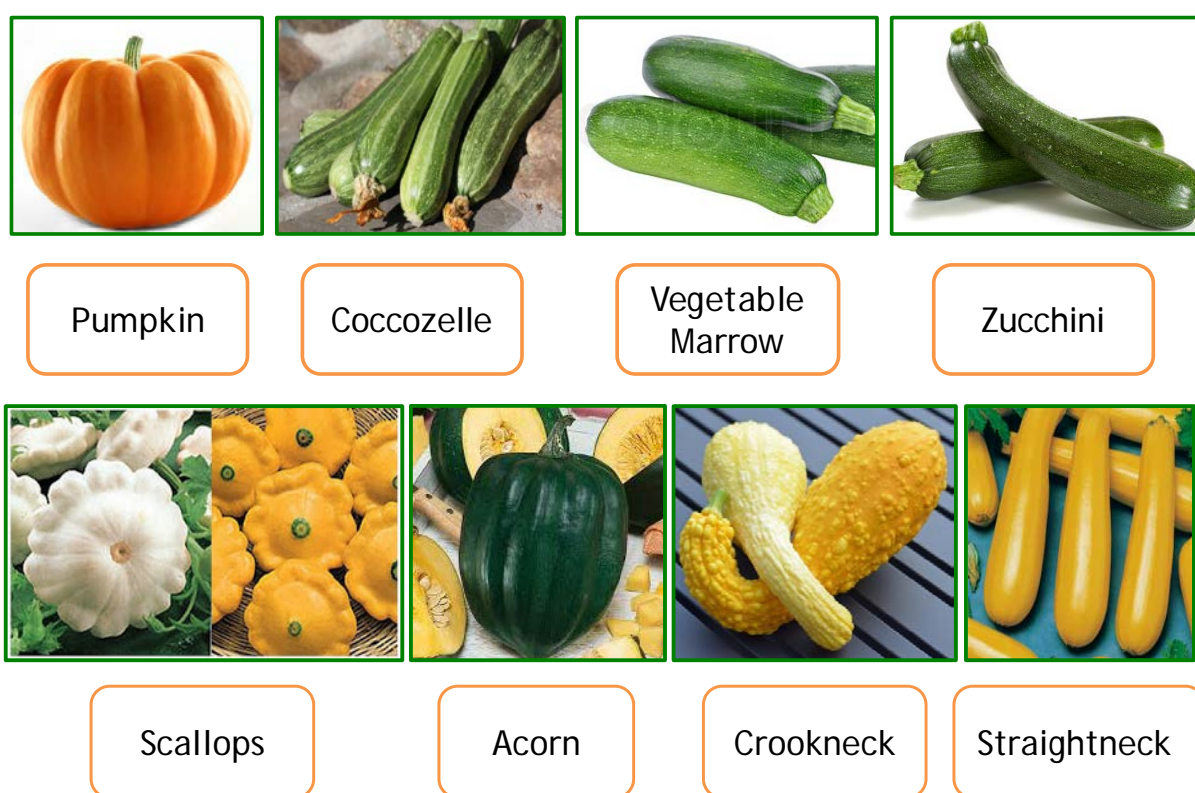


Figura 1.13.- Representación de los frutos de los 8 morfotipos comestibles de *C. pepo*. En la línea superior aparecen los frutos de los morfotipos pertenecientes a la subespecie *pepo* y en la inferior los frutos de los morfotipos de la subespecie *ovifera*. Elaboración propia.

El calabacín se corresponde con la variedad Zucchini. La palabra Zucchini proviene del diminutivo en plural de la voz italiana "zucca" que significa calabaza de verano. Es la variedad más reciente de *C. pepo*, ya que se diversificó en Italia más tarde que las otras variedades y de forma más restringida (Paris, 2001). Posteriormente se introdujo en USA desde Italia durante los años veinte y en tan solo diez años se constituyó como un grupo bien definido (Paris, 1989).

Las variedades de Zucchini que se cultivan en la actualidad son híbridos mejorados en Estados Unidos durante los últimos 50 años, procedentes de variedades italianas, en su mayoría de fruto verde oscuro o amarillo, habiéndose convertido en la calabaza de verano más importante desde el punto de vista económico.

El calabacín es una planta anual, de crecimiento indeterminado y porte rastrero con un sistema radicular constituido por una raíz principal axonomorfa, que alcanza un gran desarrollo en relación con las raíces secundarias, las cuales se extienden superficialmente. Pueden aparecer raíces adventicias en los entrenudos de los tallos cuando se ponen en contacto con tierra húmeda.

Sobre el tallo principal se desarrollan tallos secundarios que llegan a atrofiarse si no se realiza una poda para que se ramifique a dos o más brazos. Presentan un crecimiento en forma sinuosa, pudiendo alcanzar un metro o más de longitud, dependiendo de la variedad comercial. Es cilíndrico, grueso, de superficie pelosa y áspero al tacto. Posee entrenudos cortos, de los que parten las hojas, flores, frutos y numerosos zarcillos. Estos últimos son delgados, de 10-20 centímetros de longitud y nacen junto al pedúnculo del fruto.

La hoja es palmeada, de limbo grande con 5 lóbulos pronunciados de margen dentado. El haz es glabro y el envés áspero y está recubierto de fuertes pelos cortos y puntiagudos a lo largo de las nerviaciones. Los nervios principales parten de la base de la hoja y se dirigen a cada lóbulo subdividiéndose hacia los extremos. El color de las hojas oscila entre el verde claro y oscuro, dependiendo de la variedad, presentando en ocasiones pequeñas manchas blanquecinas. Las hojas están sostenidas por pecíolos fuertes y alargados, recubiertos con fuertes pelos rígidos.

Respecto a la floración, el calabacín es una especie monoica, por lo que en una misma planta coexisten flores masculinas y femeninas. Las flores son solitarias, vistosas, axilares, grandes y acampanadas. El cáliz es zigomorfo (presenta un solo plano de simetría) y consta de 5 sépalos verdes puntiagudos. La corola es actinomorfa y está constituida por cinco pétalos de color amarillo. La flor femenina se une al tallo por un corto y grueso pedúnculo de sección irregular pentagonal o hexagonal, mientras que en las flores masculinas (de mayor tamaño) dicho pedúnculo puede alcanzar una longitud de hasta 40 centímetros. El ovario de las flores femeninas es ínfero, tricarpelar, trilobular y alargado. Los estilos, en número de tres, están soldados en su base y son libres a la altura de su inserción con el estigma, este último dividido en 2 partes. Las flores masculinas poseen tres estambres soldados.

El fruto es pepónide carnoso, unilocular, y sin cavidad central. Éstos pueden presentar diferentes formas (cilíndrica, alargada y redondeada) y colores (verde oscuro, claro, amarillo e incluso blanco). La piel lisa puede ser jaspeada o presentar aristas según la variedad. El fruto maduro contiene numerosas semillas y no es comercializable debido a

la dureza del epicarpio y a su gran volumen. Las semillas son de color blanco-amarillento, ovales, alargadas, puntiagudas, lisas, con un surco longitudinal paralelo al borde exterior, longitud de 1,5 centímetros, anchura de 0,6-0,7 centímetros y grosor de 0,1-0,2 centímetros.

Presente en el mercado durante todo el año, el calendario de comercialización obedece a los ciclos de siembra y recogida, divididos habitualmente en extra-temprano (siembras de agosto-septiembre; recolección de septiembre hasta finales de diciembre), temprano (siembra de octubre-noviembre; recolección desde final de noviembre hasta finales de febrero), semi-tardío (siembra en febrero; recolección desde marzo hasta junio) y tardío (siembra a principio de abril, iniciándose la recolección en junio). Existen infinidad de variedades e híbridos, entre los que se pueden destacar como más comerciales los que se describen a continuación clasificados por colores:

Calabacín verde:

- Tamaño variable, según variedades, forma cilíndrica alargada o apepinada. Algunos pueden presentar ligera curvatura o tener aspecto globoso en el extremo.
- Piel lisa, color verde, según tipos, más o menos oscura, brillante y con algún jaspeado.
- Interior reticulado, carne blanquecina, jugosa, suave y agradable, que contiene semillas planas, ovales, blanco amarillento, casi inapreciables para el paladar.
- Para consumir en su momento óptimo, la recolección se realiza cuando el fruto aún no está maduro, media madurez. El fruto maduro presenta gran cantidad de semillas y no es comercializable por su dureza y volumen. Buen transporte y conservación.

Calabacín blanco:

- Tamaño medio/largo, cilíndrico algo globoso en el extremo. Más tardío.
- Piel lisa, con posibilidad de aristas, color blanco cremoso.
- Aunque el color exterior varía, el interior y la carne presentan los mismos rasgos que el resto de las variedades.
- Buen transporte y conservación.

1.3.3.- Importancia económica y distribución geográfica

La obtención de datos sobre la producción y comercialización del calabacín por países presenta dificultades, ya que en la mayoría de las estadísticas oficiales se incluyen conjuntamente a calabazas y calabacines. A pesar de ello, se tienen estimaciones que indican que el país más productor es China con 7.000.000 t, seguida de India (4.900.000 t), Federación Rusa (1.080.845 t), USA (900.880 t), Ucrania (587.800 t) y Egipto (559.606 t). Datos de Faostat 2012.

En la **Tabla V** se recogen los datos correspondientes a España de acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura sobre el calabacín exclusivamente. La superficie y producción en el periodo comprendido entre 1999 y 2011 ha oscilado relativamente poco, con un mínimo de 5.500 ha en 2001 a 8.100 ha en 2011, y con un valor medio anual de 6.800 ha. La producción oscila también entre valores estrechos, con un mínimo de 262.500 t en 2001 y 403.400 t en 2011.

Tabla V.- Serie histórica de superficie, producción y comercio exterior de calabacín desde 1999 hasta 2011.

Años	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)	Exportaciones (toneladas)
1999	6,3	302,8	143.315
2000	6,2	297,0	172.261
2001	5,5	262,5	170.728
2002	6,2	301,5	176.634
2003	6,3	303,5	181.515
2004	6,5	303,5	215.992
2005	6,8	299,0	196.965
2006	7,1	334,0	218.373
2007	6,7	316,7	215.834
2008	7,2	347,0	225.512
2009	7,4	362,8	203.971
2010	7,6	366,5	215.000
2011	8,1	403,4	270.919

Fuente MAPA. 2014

La exportación presenta, un aumento más acusado, si bien en los años iniciales se observa una ligera evolución para alcanzar en 2011 la exportación máxima de 270.919 t. (Figura 1.14).

España e Italia son los principales productores de la UE con diferencia, siendo a la vez los de mayor consumo per cápita, con 2,8 y 3,5 Kg respectivamente. Así mismo son los mayores exportadores, siendo los principales importadores de calabacín producido en España, Francia, Reino Unido y Alemania.

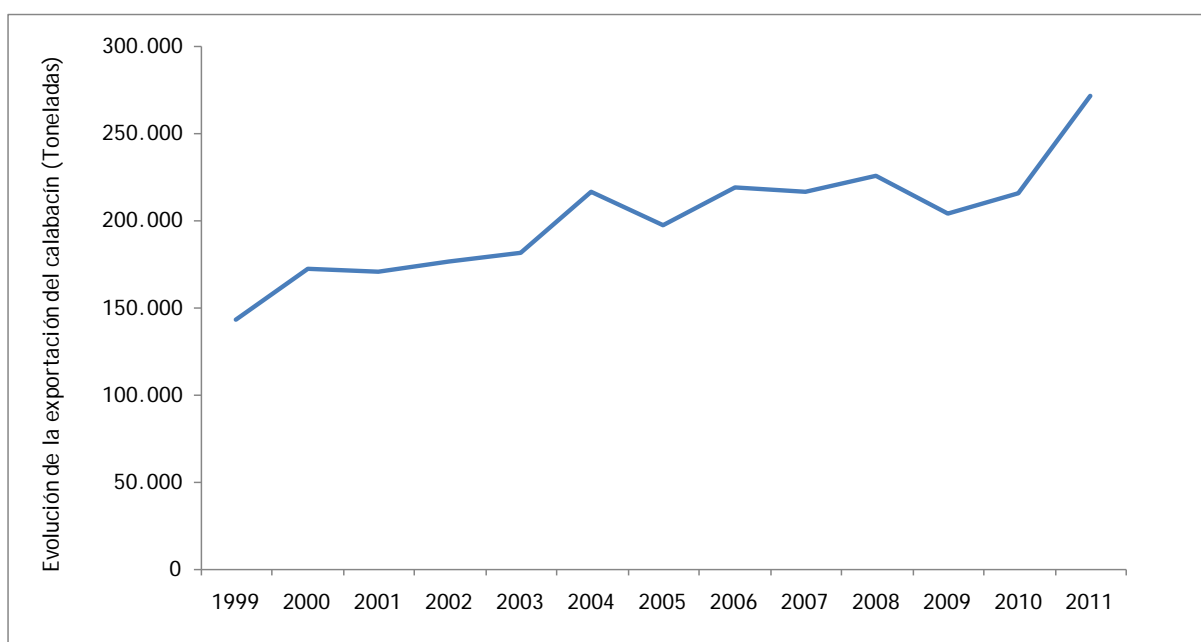


Figura 1.14.- Evolución de la exportación del calabacín expresado en toneladas desde el año 1999 hasta el 2011. Fuente MAPA

En la **tabla VI** se recoge la distribución de la superficie y producción de calabacín por Comunidades Autónomas, en donde se pone de manifiesto el predominio de Andalucía, que llega a producir el 83,72% del total nacional. Por provincias la principal productora es Almería con el 74,13 del total. El resto de la producción se encuentra distribuido en porcentajes inferiores al 5%, siendo la segunda en importancia Canarias. Murcia ocupa el cuarto lugar, con una participación del 2,17%.

Tabla VI: Superficie y producción en 2011 por Comunidades Autónomas.

Comunidad Autónoma	Superficie (Ha)		Producción (toneladas)	% sobre total nacional
	Aire libre	Protegido		
Galicia	83		4.864	1,21%
P. Asturias	12		270	0,07%
Cantabria	2		40	0,01%
País Vasco	28	2	625	0,15%
Navarra	92		5.295	1,31%
La Rioja	19	3	894	0,22%
Aragón	8	2	270	0,07%
Cataluña	277	7	9.212	2,28%
Baleares	130	12	2.476	0,61%
Castilla León	80		1.990	0,49%
Madrid	28		840	0,21%
Castilla La Mancha	164		4.048	1,00%
C. Valenciana	176	5	4.260	1,06%
R. de Murcia	316	61	8.771	2,17%
Extremadura	110		3.822	0,95%
Andalucía	726	5.397	337.721	83,72%
Canarias	252	152	17.982	4,46%
España	2.503	5.641	403.380	100,00%

Fuente: MAPA 2014

1.3.4.- Composición química y valor nutricional

La calidad nutricional se basa en el contenido calórico y de nutrientes del alimento. El principal componente del calabacín es el agua, seguido de los hidratos de carbono y muy pequeñas cantidades de grasas y proteínas. Si unimos su aporte moderado de fibra nos encontramos ante un alimento idóneo para las dietas hipocalóricas, por su bajo aporte en calorías, como se observa en la **Tabla VII**, con una energía de 17 kcal/100g de peso fresco.

Destaca su bajo contenido en lípidos, tanto en los saturados e insaturados y en proteínas. En cuanto al componente vitamínico tiene un amplio espectro de diferentes vitaminas, con un discreto contenido de ácido ascórbico y contenidos de folatos y de vitaminas del grupo B normales para un vegetal.

En cuanto a su contenido de bioelementos destaca su alto contenido en potasio y bajo en sodio, además de tener pequeñas cantidades de magnesio, hierro y fósforo. La elevada relación K^+/Na^+ lo hace recomendable para la dieta de los hipertensos. El potasio es necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, así como para el equilibrio acuoso dentro y fuera de la célula.

Tabla VII.- Composición química y valor nutricional por 100g de calabacín

Energía (Kcal)	17	Fósforo (mg)	31
Agua (g)	94	Potasio (mg)	230
Proteínas (g)	1,8	Calcio (mg)	19
Glúcidos disponibles (g)	2	Hierro (mg)	0,4
Glúcidos disponibles (g mono)	2	β caroteno (µg)	320
Azúcares (g)	1,9	Vitamina E (mg)	trazas
Almidón (g)	0,1	Ácido ascórbico (mg)	20
Fibras (g)	1	Tiamina (mg)	0,05
Lípidos (g)	0,2	Riboflavina (mg)	0,04
Ácidos grasos saturados (g)	0,04	Niacina (mg)	0,042
AG. Monoinsaturados (g)	0,02	Ácido pantoténico (mg)	0,07
AG. Poliinsaturados (g)	0,09	Vitamina B6 (mg)	0,07
Sodio (mg)	3	Folatos (µg)	24
Magnesio (mg)	18	Porción comestible %	85

Fuente.-Infoagro

1.3.5.- Comportamiento del calabacín en posrecolección

Como se indicó precedentemente la recolección se realiza cuando los frutos están inmaduros y por tanto cuando aún están en crecimiento activo. El conocimiento de los parámetros biológicos es esencial para evaluar y determinar las condiciones de conservación refrigerada del producto.

En la **Tabla VIII** se recogen algunos parámetros que nos dan una idea de cuál será el comportamiento del calabacín cuando se sometan a la manipulación, almacenamiento y comercialización.

Tabla VIII. Parámetros biológicos del calabacín.

Calor de respiración (Kcal/t*24h) a:		
0°C	-	
5°C	900	
10°C	2000	Miccolis (1990)
15°C	4000	
20°C	5000	
Tasa producción etileno (µL/kg*h) a 10°C	0,1 a 1	Mencarelli <i>et al</i> 1983
Clasificación de la tasa de producción de etileno	Baja	
Pauta de maduración	No climatérica	
Sensibilidad a los daños de etileno	Media	Shapiro (1985)
Sensibilidad a los daños por frío	Si	Lutz y Hardenburg(1968)
Temperatura por debajo de la cual se producen daños por frío	7°C	

Fuente:Namesny, 1999

Debido a que su recolección se hace cuando todavía no han alcanzado la madurez y se encuentran en fase de crecimiento, poseen una alta tasa metabólica, con un calor de respiración muy elevado con respecto a otras hortalizas (Lutz y Handenburg 1968).

Por el contrario la producción de etileno es muy baja, no superando por lo general $1\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ a 10°C y lo que es más importante es que presenta una pauta no climatérica, por lo que no tiene lugar una síntesis autocatalítica de la hormona de la maduración durante el desarrollo y maduración del fruto.

En la conservación poscosecha del calabacín hay dos factores que limitan su vida útil comercial, su alto calor de respiración y su sensibilidad a los daños por frío, no pudiendo bajar la temperatura de 7°C e incluso más elevadas ($10^{\circ}\text{-}12^{\circ}\text{C}$) en función de la variedad y del estado de madurez. Esta circunstancia hace que el fruto sea muy sensible al marchitamiento y a la pérdida de peso. El calabacín recolectado en un estado precoz o más tierno se deshidrata más fácilmente, debido a que su piel está menos formada. En siete días, calabacines con un peso de en torno a 100 gramos pueden perder hasta un 7% de su peso, aumentando al 10% cuando el peso es de 60 gramos (Sois, 1980).

La temperatura de conservación también influye en un factor de calidad del calabacín, la pérdida de color verde de la corteza, que se produce por una degradación de las clorofilas y el amarillamiento de la misma. Cuanto mayor es la temperatura más rápidamente se ponen de manifiesto estos procesos degradativos y antes pierde la frescura el producto.

Desde hace tiempo se sabe que el calabacín es sensible a los daños por frío (Mencarelli *et al.*, 1983) y ya se han citado precedentemente algunos trabajos en los que se ha estudiado este problema. Cuando se almacenan los frutos a temperaturas inferiores a $4^{\circ}\text{-}5^{\circ}\text{C}$ durante varios días, que oscilan entre 4 y 10 días según los autores, aparecen sobre la piel pequeñas zonas deprimidas que tienen una apariencia de picado o moteado, y que en fases avanzadas pueden incluso penetrar en la pulpa. Los síntomas pueden observarse en la cámara frigorífica, pero aumenta su intensidad al cabo de los dos o tres días de haber sido transferidos a temperatura ambiente (Kramer y Wang, 1989).

Como en la mayoría de los frutos el desarrollo de los DF está influenciado por la genética, o variedad, el cultivo y estado de maduración. Así, los calabacines recolectados en un estado muy precoz y con un alto contenido en agua son más sensibles a las bajas temperaturas (Tesi, 1987).

La utilización de variedades distintas también ha puesto de manifiesto un comportamiento diferente, pues mientras que Mencarelli *et al* (1983) con calabacines del tipo común encuentran que a 5°C y durante dos semanas la mayoría de los frutos no presentaban DF, en la variedad "Romanesco" conservada a la misma temperatura pero con un periodo de tiempo más largo, se encontró que el porcentaje de frutos con DF fue muy alto (Mencarelli, 1987).

Serrano *et al* (1996) en calabacines conservados a 2°C encontraron a los 4 y 14 días síntomas de picado en la piel, del orden del 45 y 81% del área respectivamente y, un

efecto ralentizador del frío sobre la producción de etileno y CO₂. Por otro lado observaron un aumento de los niveles de poliaminas y ácido abscísico (ABA).

En experiencias realizadas sobre calabacines amarillos se aprecia una pérdida mayor de peso en los conservados a 2°C que en los controles (15°C) y un aumento de la tasa respiratoria. El etileno tiene un comportamiento similar hasta el último muestreo, donde disminuye significativamente, lo que podría indicar que tras un periodo largo de conservación a 2°C los DF afectan al metabolismo del fruto (Mc Collum, 1989).

Mientras que a 2,5°C se hacen visibles los DF al cabo de ocho días, en los frutos conservados a 10°C no se observa ningún picado en la piel. Si en los controles se aprecia una disminución de los niveles de CO₂ y C₂H₄, en los conservados a baja temperatura se produce un aumento intenso de la producción de ambos gases a los cuatro y ocho días respectivamente. Los resultados muestran que la irreversibilidad de los daños tiene lugar mucho antes que la aparición de los mismos (Balandran *et al.*, 2003).

Como ya se ha comentado cuando el calabacín se expone a bajas temperaturas algunos enzimas se ven afectados y el normal metabolismo de la célula se ve alterado. La conservación a bajas temperaturas hace que la β-galactosidasa, tanto en pulpa como en piel, disminuya, mientras que la poligalacturonasa presenta una mayor actividad en el endocarpio a 2,5°C y en el exocarpio, al contrario, la actividad es superior a la temperatura ambiente (Balandran *et al.*, 2007).

Para evaluar los efectos de los DF sobre la inducción del estrés oxidativo durante la conservación a 0°C se ha determinado el nivel de peróxido de hidrógeno, y la actividad de la catalasa y peroxidasa en pulpa y piel, así como la velocidad de oxidación de succinato, actividad de la oxidasa alternativa, la fluidez de la membrana y la composición de los fosfolípidos en mitocondrias aisladas. En las etapas iniciales de la conservación a 10°C se observa una disminución del peróxido de hidrógeno, un aumento de la actividad de los enzimas detoxificantes, una recuperación de la fluidez de la membrana mitocondrial y un aumento de la actividad de la oxidasa alternativa (AOX), y a 0°C en la pulpa la actividad de la peroxidasa y AOX también aumentan al principio aunque menos, y posteriormente durante la conservación, sugiriendo que este fruto puede activar los sistemas reguladores ROS, probablemente para prevenir la aparición prematura de los DF visibles (Gualanduzzi *et al.*, 2009).

Se ha investigado la relación entre el estado de madurez, el contenido de poliaminas y los DF, encontrándose que el desarrollo de los mismos, cuando se almacenan los calabacines a 5°C, disminuye con la madurez, y que las poliaminas alcanzaban el valor máximo al día siguiente de la polinización y disminuían con la maduración. Mientras que los niveles de putrescina aumentan durante la conservación, pero siendo más significativo en los estados inmaduros, en casi todos los estados de maduración se observa una disminución de espermidina y espermina (Tatsumi *et al.*, 1995).

Gajewski (2003) estudia la calidad en general de la variedad "Astra", sin hacer referencia explícita a los DF, y encuentra que la vida comercial útil depende del estado de madurez, siendo más prolongada cuanto más avanzada es la misma. Las características físicas y sensoriales son mejores cuando la conservación se efectúa a 6°C que a 3°C y la atmósfera controlada con niveles del orden del 3% en O₂ y 5/3% de CO₂ ralentiza los cambios sensoriales.

Diversos parámetros de calidad relacionados con los DF se han analizado en diferentes variedades de calabacín, encontrando que de las variedades cultivadas en febrero, en la zona de Almería, "Natura" es la que mejor se adapta al almacenaje a 4°C, ya que sus frutos son los que sufren menos daños, presentando menores pérdidas de peso y niveles más bajos de malondialdehído (MDA) y H₂O₂. Se han detectado también variaciones genéticas para algunos de los parámetros analizados y hay una correlación positiva entre los DF con los niveles de MDA y H₂O₂ y negativa con la catalasa (Carvajal *et al.*, 2011).

Cuando se indicaron los efectos de las bajas temperaturas sobre las modificaciones del metabolismo y los daños que producían, se puso de manifiesto el interés que había despertado la aplicación de diferentes tratamientos para el control de los daños por frío. En efecto lograr eliminar o reducir los DF es muy importante ya que permitiría aplicar el frío y por lo tanto optimizar las ventajas de esta tecnología de conservación a numerosos frutos y hortalizas tropicales y subtropicales que son sensibles a esta fisiopatía (Wang, 1993; Wang, 2006).

En el calabacín, los tratamientos que más se han estudiado han sido los relacionados con el preacondicionamiento con temperatura superior a la de conservación, y las atmósferas modificadas, con diferentes niveles de O₂ y CO₂.

Un prealmacenamiento a 10-15°C antes de la conservación a 2,5° y 5°C ha demostrado ser efectivo para retrasar la aparición de los DF, doblando el tiempo en que aparecen con respecto a los controles. Con calentamientos intermitentes en ciclos de 2 días a temperaturas bajas y un día a 20°C disminuye la superficie del calabacín afectada por picado (Kramer y Wang, 1989).

Estos mismos autores encuentran resultados similares sometiendo a los frutos a un pretratamiento térmico de dos días a 10°C. En los controles a 2,5°C el aumento de los DF está correlacionado con un aumento de la putrescina y disminución de espermidina y espermina (Kramer y Wang, 1989).

El estudio de los fosfolípidos pone de manifiesto que la relación esterol libre/total fosfolípidos aumenta durante el almacenamiento en frío, mientras que cuando el fruto es sometido a un precalentamiento el aumento de esta relación no se produce, lo que parece indicar que la aclimatación protege a las membranas de la degradación de los glicerolípidos (Wang *et al.*, 1992).

El aumento de la resistencia a los DF en este tipo de tratamiento parece que está relacionado con un aumento de los enzimas responsables de la captación de radicales libres, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, ascorbato peroxidasas y glutatión reductasa (GR) (Wang, 1995a; Wang, 1995b).

Se ha comprobado que los niveles de ABA aumentan cuando se somete el calabacín a un acondicionamiento a 10°C durante dos días antes de conservarlos a 2,5°C y que los DF se reducen significativamente. Tratamientos exógenos con la hormona también disminuyen los efectos de la fisiopatía, por lo tanto se ha considerado la posibilidad de la participación de la hormona en los procesos de degradación de las membranas (Wang, 1991).

La utilización de agua caliente a 42°C durante 30 minutos, no solo no afecta a la calidad del fruto, si no que reduce los DF. Se pone de manifiesto un aumento de putrescina y disminución de espermidina y espermina durante la conservación exclusiva a 2,5°C, mientras que el tratamiento con agua caliente induce el incremento de estas dos últimas poliaminas (Wang, 1994).

El incremento de la tolerancia a los daños por frío cuando se hace un tratamiento de precalentamiento se ha correlacionado con el aumento de las actividades enzimáticas de la superóxido oxidasa (SOD), catalasa, ascorbato peroxidasa (AP) y glutatión reductasa (GR). Los resultados encontrados por Wang (1995 a; 1995 b) parece ser que indican que la aclimatización a la temperatura de daños puede también involucrar modificaciones en la actividad de las enzimas captadoras de radicales libres.

En condiciones de pretratamiento térmico similares también se han encontrado alteraciones en glutatión y actividad glutatión reductasa con respecto a los controles no tratados (Wang, 1995). También se ha encontrado que se afectan los enzimas relacionados con el ascorbato (ascorbato reductasa, ascorbato peroxidasa, y dehidroascorbato reductasa). La disminución del ácido ascórbico es muy inferior en los calabacines tratados con pretratamiento térmico que los controles, mientras que no hay diferencias en el contenido de ácido dehidroascórbico (Wang, 1996).

Las atmósferas controladas (AC) o modificadas (AM) reducen la sensibilidad a los daños por frío. Así, calabacines conservados en AC con un contenido entre el 1 y 4% de O₂ y sin CO₂ y a 2,5°C (Mencarelli *et al.*, 1983) y a 5°C en una atmósfera con 21% de O₂ y 5% de CO₂ (Mencarelli, 1987) mostraron una disminución de los DF con respecto a las mismas temperaturas pero en aire.

Como en otras conservaciones bajo AC y AM, las concentraciones de O₂ y CO₂ respectivamente bajas y altas, inducen la aparición de sabores extraños y en ocasiones desagradables. También se ha comprobado que los beneficios de un ambiente bajo en oxígeno desaparecen rápidamente. Los niveles bajos de oxígeno y altos de anhídrido carbónico, junto a las bajas temperaturas disminuyen la producción de etileno, ya que el

primero es esencial para el normal funcionamiento de la ACC sintetasa y el CO₂ es un antagonista de la síntesis de la hormona de la maduración.

En calabacines de la variedad "Ambassador" la extensión del "picado" en la piel disminuye de forma significativa los primeros 12 días de almacenamiento bajo una concentración de O₂ del 1% a 2,5°C. Los niveles de espermidina y espermina se mantienen elevados en frío o en los controles a temperatura ambiente. Los incrementos de putrescina y espermidina en la piel parece ser que se deben a las bajas temperaturas, mientras que a temperatura de 12,5°C no se detecta ningún incremento de las poliaminas (Wan y Ji, 1989).

Los pretratamientos con niveles de CO₂ del 5% y 40%, durante 24 horas antes de su almacenamiento a 2,5°C, reducen la extensión del "picado" en la piel del 93% al 40% y 25% respectivamente al cabo de 12 días.

Los niveles de putrescina y ABA aumentan en la piel durante la conservación, pero en menor proporción que los que se colocaron al aire (Serrano *et al.*, 1998).

También se ha encontrado que atmósferas con bajos niveles de O₂ son beneficiosos para la conservación de rodajas de calabacín, disminuyendo el % de afectados con pardeamiento del 21% en los controles al 1,8 % con una concentración de O₂ del 0,25% (Izumi *et al.*, 1996).

Compuestos del tipo jasmonato o salicilato no se han utilizado, de momento, mucho para reducir o eliminar los DF en calabacín. Los escasos resultados que se tienen ponen de manifiesto un retraso en la aparición de los mismos, lo que permite alargar la vida comercial útil, y una posible regulación a través de los niveles de ABA y poliaminas. Así la infiltración de metiljasmonato hace que el ácido abcísico en la piel aumente tras el tratamiento, mientras que putrescina también se incrementa pero en los tratados y controles, y espermidina y espermina disminuyen. (Wang y Buta, 1994). Estos mismos autores encuentran que el metiljasmonato no solo tiene efectos sobre la aparición y desarrollo de los DF, sino que también en la calidad, al limitar las pérdidas de glucosa y fructosa y ácido málico, que son respectivamente los carbohidratos y ácido orgánico predominante en el calabacín (Wang y Buta, 1999).

También se ha comprobado que el tratamiento con metiljasmonato aumenta la capacidad antioxidante, la actividad de los enzimas antioxidantes y la capacidad secuestradora de radicales libres de los tejidos, lo que sugiere que previenen los DF a través de un mecanismo que protege los tejidos de los daños producidos por los radicales libres (Wang, 2006).

Como sugieren algunos de los trabajos las poliaminas pueden jugar un papel importante en la limitación de los DF, debido a su función estabilizadora de las

membranas. Wang (1993) sugiere que el incremento en los niveles de espermidina y espermina, es responsable de la resistencia a los DF en calabacín.

La utilización de ceras también reducen la aparición y desarrollo de los DF, debido a que las pérdidas de humedad son limitadas y a la modificación de los niveles de O₂ y CO₂. Así, con una cera natural (Biocoat R) hay una disminución significativa del 50% de los DF (Fonseca y Cinco, 2006)

Los diferentes estudios realizados sobre los DF en calabacín, ponen de manifiesto que su sensibilidad reduce considerablemente su vida comercial útil y, que los procedimientos aplicados para controlar sus efectos son limitados ya que solo retrasan la aparición de los daños o los reducen parcialmente. También es interesante resaltar que los mecanismos que alteran estos tratamientos para disminuir la sensibilidad a la fisiopatía no se han estudiado en profundidad y quedan lagunas por esclarecer.

Esquemáticamente se pueden resaltar los siguientes aspectos:

- El calabacín es un fruto no climatérico con una producción de etileno muy baja.
- Es sensible a los daños por frío cuando se conservan a temperaturas inferiores a 6°C.
- Inicialmente los daños se manifiestan en la piel, generalmente como un "picado" o depresiones de diámetro pequeño, que adquieren una coloración verde-marrón. Los daños se intensifican cuando se transfieren de la temperatura fría a la ambiente.
- La intensidad de los daños depende de la variedad y del estado de madurez, siendo más acusados cuando se recolectan en un estado precoz.
- Las atmósferas controladas y modificadas tienen un efecto positivo, retrasando y limitando los daños, siendo más adecuados al aumentar las concentraciones de CO₂.
- El preacondicionamiento previo a temperaturas más elevadas (de 10 a 20°C) durante un periodo de tiempo que oscila sobre las 24 horas, también disminuye los DF, cuando se conservan los frutos a temperaturas entre 2,5° y 5°C.
- La disminución de los daños por frío parece que están relacionados con el aumento del ABA, poliaminas y de enzimas responsables de la captación de radicales libres.

1.4.- CHIRIMOYA

1.4.1.-Origen

Aunque todavía hay cierta controversia sobre su origen la mayoría de los expertos (Fouqué, 1972; Ochse *et al.*, 1974) consideran que fue en los Andes peruanos y las montañas de Ecuador, en áreas comprendidas entre los 1500 y 2000 metros de altitud donde crece espontáneamente. Algunos historiadores incluyen también las zonas andinas de Chile y Colombia. El primer centro de diversidad probablemente tuvo lugar en el Vavilov en Sudamérica. Hermoso *et al* (1999) sugiere un segundo centro de diversidad en América Central, de acuerdo con las investigaciones de Perfectti (1995) con marcadores moleculares.

Independientemente de su origen, la chirimoya es un fruto que hace muchísimo tiempo que fue domesticado, como lo demuestra el hecho de que se han hallado semillas en tumbas de más de 4.000 años de antigüedad en zonas arqueológicas de Ancón y Huarmey (Perú). Así mismo se han identificado representaciones de la chirimoya en numerosas cerámicas de la cultura Moche (Perú).

Los primeros exploradores españoles la denominaron “manjar blanco” y la introdujeron en los países mediterráneos, así como en Asia a través de África. La forma actual de la palabra chirimoya proviene de las lenguas quechua, aimara y mochica, lo que indica que es el resultado de varios procesos lingüísticos protagonizados por esas tres lenguas aborígenes. Otros autores consideran que solo procede del quechua y cuya traducción sería: “Chiri” igual a frío y “moya” a semilla.

1.4.2.- Taxonomía y morfología

La chirimoya pertenece a la familia *Annonaceae* y al género *Annona*. El número de géneros y especies se encuentra todavía a debate. Se considera que la familia de las *Annonaceae* tiene 46 géneros y entre 500 y 600 especies, y Fries (1959) afirmó que contenía 119 géneros y sobre 2000 especies. Popenoe (1974) describió la familia conteniendo entre 40 y 50 géneros y más de 500 especies, la mayoría de las cuales son arbustos o pequeños árboles. Un limitado número de especies producen frutos comestibles, incluidos muchas salvajes y otras que han sido domesticadas (Ochse *et al.*, 1974). La mayoría de las especies se cultivan en los trópicos y solo unos pocos géneros están presentes en la zona templada.

La especie más cultivada y comercializada es la *A. cherimola*, aunque hay otras que también presentan un cierto interés, como *A. reticulata*, *A. muricata*, *A. squamosa* y la *A. senegalensis*.

El árbol de la chirimoya es caducifolio, pero en zonas con inviernos suaves se torna perennifolio facultativo, del que no se desprenden las hojas viejas hasta la salida de los nuevos brotes. Es de crecimiento lento, puede adquirir en su madurez una altura de 7 a 8 m, presenta exuberante follaje, porte erguido y a veces ramificado.

Presenta un tallo cilíndrico, de corteza gruesa, y su sistema radicular es superficial y ramificado originando dos o tres pisos a diferentes alturas, pero poco profundo.

Las hojas son simples, enteras, de disposición alterna, de forma ovada u ovada-lanceolada y de color verde oscuro. Además son pubescentes en el haz y poseen un peciolo hueco en el punto de inserción con el tallo, que protege la yema que da origen a nuevos brotes.

Las flores, hermafroditas, son muy aromáticas, poco llamativas, solitarias o en grupo de dos o tres, sobre un corto e inclinado pedúnculo inserto en las axilas de las hojas del año previo y hasta que no se cae la hoja esa yema no puede desarrollarse. El cáliz consta de 3 sépalos de color verde oscuro, pequeños y de forma triangular. La corola está formada por tres pétalos bien desarrollados, carnosos, de color verde que miden de 2,5 a 4 cm de longitud. La parte masculina de la flor consta de numerosos estambres (150-200), dispuestos helicoidalmente muy juntos sobre un receptáculo, formando una masa compacta y blanca oprimida por los pétalos. La parte femenina posee también un elevado número de carpelos (de 100 a 200), con un solo óvulo, dispuestos en espiral, formando un cono compacto en cuyos extremos se encuentran los estilos y estigmas.

La polinización puede ser natural o artificial. La primera es deficiente debido a que los polinizadores naturales se encuentran en bajas poblaciones o sencillamente no se encuentran, además existe el problema de la falta de solape entre la maduración de los órganos masculinos y femeninos y la necesidad de polinizar un elevado número de carpelos para obtener frutas de calidad. Otra dificultad para utilizar este sistema es que cuando esta polinización es insuficiente la mayoría de los frutos son deformes, debido a que el insecto polinizador no cubre todos los estigmas con polen.

Con la polinización manual, recolectando previamente el polen, se garantiza una cosecha mínima todos los años, de mayor calibre y calidad. Los inconvenientes que tiene son el coste de la mano de obra y que el número de semillas por 100 gramos de fruto es mayor. Por el contrario la recolección es más fácil y de menor coste cuando la polinización está concentrada.

La chirimoya es una baya con numerosas semillas de color negro, ovoides y brillantes. Es una infrutescencia de color verde, que al madurar toma un color más pálido. Es un fruto complejo, formado por la unión de los pistilos con el receptáculo, del tipo de los denominados sincarpas, no se abre en la madurez y tiene la pulpa blanquecina.

En nuestro país la variedad más cultivada es la "Fino de Jete", que en la actualidad supone el 90% de la producción nacional. El cultivar, originario por selección clonal en la población granadina de Jete, es rústico y productivo, de color claro, con una piel en forma de escudetes impresos.

La otra variedad cultivada, aunque minoritaria, es la "Campas", que procede de una selección local anterior a la década de los cincuenta. Debido a la forma de la piel pertenece a la variedad botánica Umbonata. Tiene un fruto más subácido que Fino de Jete, con menos índice de semillas y además más sueltas.

Al ser un árbol de origen subtropical prefiere un margen estrecho de condiciones climáticas, sin grandes oscilaciones térmicas. No tolera las heladas, y el factor más limitante es la baja temperatura que puede incidir sobre la falta de cuajado, siendo las condiciones ideales de 25 a 28°C y humedades relativas entre el 60-70%. La temperatura media que se acepta como límite para su cultivo es la de 13°C, en los meses más fríos.

Es un árbol muy susceptible a las heladas, y temperaturas por debajo de -2°C ocasionan daños tanto en la madera como en las hojas y frutos, siendo irreversibles si la temperatura permanece durante varias horas.

1.4.3.- Importancia económica y distribución geográfica

El cultivo del chirimoyo no está muy extendido ya que se encuentra limitado a zonas subtropicales. España es donde mayor es la producción, centrándose en la zona de la costa de Málaga y Granada. Otros países productores son Taiwán, Perú, Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia, USA, Sudáfrica e Israel, pero en algunos de ellos puede considerarse como testimonial.

En la **tabla IX** se recogen los datos correspondientes a nuestro país de acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Agricultura. Tanto la superficie como la producción ha oscilado relativamente poco entre 1999 y 2007, si bien esta última experimentó una subida en 2008 para disminuir al año siguiente, y posteriormente volver a incrementarse dicha producción en el año 2010. La superficie está situada sobre las 3.200 hectáreas y la producción sobre las 50.000 toneladas.

Tabla IX.- Evolución de la superficie y producción de chirimoya en España

Años	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
1999	3021	34.864
2000	3080	31.208
2001	3238	32.035
2002	3241	27.828
2003	3263	25.853
2004	3270	22.710
2005	3218	22.421
2006	3219	29.025
2007	3270	29.671
2008	3226	51.356
2009	3158	38.775
2010	3177	50.241
2011	3158	50.150

Fuente: MAPA. 2014

Dado la rápida maduración de la chirimoya y sus dificultades de maduración la exportación es testimonial, aunque en los últimos años se ha despertado interés en países como Francia, Alemania y Reino Unido.

En la tabla X se recoge la distribución de la superficie cultivada y producción, en el año 2011, por provincias, en donde se observa que el cultivo se centra exclusivamente en Andalucía y de forma más concreta en la provincia de Granada.

Tabla X. Superficie y producción en 2011 por provincias

Provincias	Superficie (Hectáreas)	Producción (Toneladas)
Baleares	2	21
Alicante	9	95
Cádiz	31	80
Granada	2.900	46.400
Málaga	211	3.519
Canarias	5	35
España	3.158	50.150

Fuente: MAPA. 2014

1.4.4.- Composición química y valor nutricional

Su componente mayoritario es el agua, aunque destaca por su aporte de hidratos de carbono, entre los que predominan la glucosa y fructosa. Como la mayoría de los frutos es pobre en grasa y proteínas, pero tiene un alto contenido calórico ya que la mayoría de los frutos tienen un contenido en azúcares superior a los 20° Brix. El contenido en fibra no es muy elevado pero le confiere propiedades laxantes y los elevados niveles de potasio lo hacen aconsejable contra la hipertensión arterial. Respecto a otros nutrientes es buena fuente de vitamina C, y de vitaminas del Complejo B, como puede observarse en la tabla XI.

Tabla XI.- Composición química y valor nutricional de la chirimoya por 100 gramos de pulpa:

Agua (g)	75,7
Carbohidratos (g)	22,0
Fibra (g)	1,8
Proteínas (g)	1,0
Cenizas (g)	1,0
Grasas (g)	0,1
Fósforo (mg)	47,0
Calcio (mg)	24,0
Hierro (mg)	0,4
Magnesio (mg)	18
Potasio (mg)	264
Vitamina A (mg)	0,01
Tiamina (mg)	0,06
Riboflavina (mg)	0,14
Niacina (mg)	0,75
Vitamina C (mg)	4,30
Calorías (Kcal)	81

Fuente: Consejo Regulador de la DO Chirimoya

1.4.5.- Comportamiento de la chirimoya en posrecolección

La chirimoya es un fruto de maduración típicamente climatérica, con una crisis etilénica y respiratoria muy intensa y de corta duración, lo que hace que en posrecolección a una temperatura de 20°C la vida comercial útil oscila entre los 5 y 8 días, dependiendo de la variedad.

En la **tabla XII** se recogen algunos parámetros del fruto que nos indican cual podrá ser su comportamiento durante la conservación.

Tabla XII. Parámetros biológicos de la chirimoya

Tasa respiración (ml CO ₂ /kg*h)	
10°C	25-100
15°C	45-150
20°C	75-250
Tasa producción de etileno (µL/kg*h)	100-300
Clasificación de la tasa de producción de etileno	Alta - muy alta
Pauta de maduración	Climatérica
Sensibilidad a los daños de etileno	Sí
Sensibilidad a los daños por frío	Sí
Temperatura por debajo de la cual se producen daños por frío	8°C

Fuente: Elaboración propia

Un aspecto importante en la conservación es la elevada tasa de respiración, que aumenta de forma acusada con la temperatura, alcanzando incluso valores superiores a los 250 ml CO₂/kg*h. La tasa de producción de etileno es también muy alta y una vez que ha alcanzado la aptitud para madurar, la síntesis autocatalítica del etileno se inicia de forma muy acusada, alcanzando rápidamente el máximo etileno, para también en un espacio de tiempo muy corto iniciarse los procesos catabólicos característicos de la senescencia.

En la conservación poscosecha de la chirimoya la temperatura es el factor que mayor efecto tiene sobre la velocidad de maduración de los frutos. La chirimoya madura tanto más rápidamente cuanto más elevada sea la temperatura, dentro de valores que normalmente se aplican a los frutos.

Cuando la conservación se realiza en los frutos subtropicales a una temperatura por encima de la normal, la maduración se acelera y suele ser anómala, pudiendo aparecer sabores extraños en la pulpa, cambios de color y textura no uniformes (An y Paull, 1990).

La aplicación de bajas temperaturas produce una maduración más pausada y por lo tanto un retraso en el inicio de la senescencia. Sin embargo la aplicación de la refrigeración en algunas especies no puede hacerse de una forma indiscriminada, ya que cuando la temperatura alcanza un valor mínimo, que suele situarse sobre los 8°-10°C se desencadenan diversos daños en la chirimoya que son los conocidos como "daños por frío", dando lugar a una maduración anómala. Esta susceptibilidad a las bajas temperaturas también depende en este fruto del cultivar, zona de producción y fecha del cuaje.

Los estudios realizados ponen de manifiesto que la temperatura mínima para evitar que se produzcan los daños por frío son los 10°C. Cuando la conservación se realiza a esa temperatura o superior todos los cambios típicos de la maduración, como el aumento de azúcares, disminución de la textura, producción de volátiles y aromas tienen lugar de forma armónica, alcanzando las características sensoriales que aprecian los consumidores en la chirimoya.

Dentro de los daños microestructurales que tienen lugar en la chirimoya, al igual que en otros frutos, se produce la degradación de las membranas celulares, incluyendo la correspondiente a los amiloplastos. A nivel microscópico los síntomas más importantes descritos son la dilatación de vesículas del retículo endoplasmático, la pérdida de ribosomas, la vesiculación de membranas y la acumulación de gotículas lipídicas en los cloroplastos y en el citosol. (Gutiérrez *et al.*, 1992).

La aparición de daños externos vienen determinados por la temperatura y el periodo de tiempo de conservación, si bien como en los otros frutos estos síntomas se hacen más visibles cuando son transferidos a temperatura ambiente. Estos síntomas se manifiestan por la aparición de zonas pardeadas o punteado en la superficie externa del fruto, la pérdida de color de la pulpa, un proceso de maduración incorrecto y la aparición de vesículas de color rosa pálido alrededor de las semillas. (Palma *et al.*, 1993). Gutiérrez *et al.* (1992) indica que aunque no aparezcan estos síntomas las bajas temperaturas pueden inhibir la maduración.

Fuster y Prestamo (1980) encuentran que "Fino de Jete" y "Campas" desarrollan pequeñas áreas bronceadas cuando son conservados a 5°C, desaconsejando esta temperatura, y los daños se ponen de manifiesto a los 5 días.

El máximo de la crisis etilénica coincide a 20°C y 10°C con el inicio de la senescencia y la amplitud de la misma depende de la temperatura, si bien no es proporcional ya que a 20°C el máximo alcanza un valor de $46,2 \pm 2,7 \mu\text{L}/\text{Kg}\cdot\text{h}$ y a 10°C no alcanza los $2 \mu\text{L}/\text{Kg}\cdot\text{h}$ (La Hoz *et al.*, 1993).

Se ha determinado la evolución de diversas actividades enzimáticas con objeto de determinar la capacidad de pardeamiento en pulpa y corteza durante el almacenamiento a diferentes temperaturas, (6°; 8°; 10°; y 23°C), encontrándose que la maduración del fruto a temperaturas inferiores a la ambiental (23°C) condicionó en el epicarpio una mayor síntesis de proteínas. La actividad polifenol oxidasa en la piel aumentó en todas las temperaturas alcanzando un máximo a los 16 días de conservación, mientras que en la pulpa hay un aumento moderado solo en los frutos que maduran a una temperatura inferior a 10°C. Mientras que la actividad peroxidasa aumentó en ambos tejidos, la catalasa se incrementó al principio de la maduración en el mesocarpio y se mantuvo estable en el epicarpio. La fosfatasa ácida fue independiente de las condiciones de maduración. (Sánchez de Medina *et al.*, 1986).

El patrón de proteínas se ve afectado por el estado de maduración del fruto y por la temperatura de conservación. Se produce una acumulación preferencial de algunos polipéptidos específicos en la crisis etilénica. También se ha observado esta acumulación en el fruto inmaduro, así como en el primer pico y segundo pico respiratorio. La expresión de polipéptidos relacionados con la maduración está fuertemente inhibida a temperaturas inferiores a 10°C (Montero *et al.*, 1993).

Resultados similares se han encontrado cuando se almacenan los frutos a 6°C, ya que no hay una acumulación de polipéptidos relacionados con el proceso de maduración y por el contrario se encuentran polipéptidos específicos de bajas temperaturas. Mientras que muchos polipéptidos encontrados en el fruto recién recolectado persisten durante el almacenamiento, algunos polipéptidos ácidos solo se detectan algunos días después de conservación a 6°C (Montero *et al.*, 1995).

En la variedad "Fino de Jete" almacenándose a 20°C alcanza el estado maduro cuando tiene lugar la segunda crisis respiratoria, alcanza la máxima concentración de azúcares solubles y ácidos orgánicos y la textura ha disminuido de forma sensible. Las bajas temperaturas reducen la producción de etileno y CO₂, si bien es necesario transferirlos a temperatura ambiente para que maduren adecuadamente. Los elevados aumentos de CO₂ no son suficientes para completar la maduración del fruto sin que tenga lugar la concurrente crisis etilénica. A temperaturas inductoras de DF se aprecia una acumulación de ácido cítrico, inhibición de la síntesis de etileno y un ligero incremento de azúcares (Alique *et al.*, 1994).

Al igual que en otros frutos las poliaminas tienen influencia sobre las alteraciones que sufren las membranas cuando son sometidas a temperaturas que inducen los daños por frío. En chirimoya la poliamina predominante en la recolección es espermidina, aunque durante la maduración se observa un incremento de putrescina.

Cuando se retrasa la maduración por acción de bajas temperaturas el aumento de putrescina es menor, no produciéndose cuando la temperatura produce DF e inhibe la maduración. Tanto espermina como espermidina se mantienen prácticamente constantes durante la maduración a 20°C, pero cambian cuando se almacenan a bajas temperaturas. Parece ser que hay una relación entre el incremento de putrescina y aumento de acidez durante la maduración (Escribano y Merodio, 1994).

El aumento de los niveles de putrescina libre están correlacionados con un aumento importante de la actividad arginina descarboxilasa, mientras que no se detecta actividad de la ornitina descarboxilasa, lo que sugiere que los cambios que experimenta la poliamina están regulados vía arginina descarboxilasa. (Escribano *et al.*, 1996).

La conservación a 6°C, inductora de la inhibición de la maduración y de los DF, modifica el metabolismo de las poliaminas frente a cuando maduran a 20°C. A bajas temperaturas espermidina, espermina y putrescina disminuyen, lo que podría sugerir que

las temperaturas que producen daños por frío afectan a la activación del catabolismo de las poliaminas o a la formación de poliaminas conjugadas (Escribano y Merodio, 1993; Escribano *et al.*, 1996).

A 20°C los niveles del 20% de CO₂ inhiben la producción de etileno, pero la ACC-oxidasa mantiene la misma actividad que al aire. El tratamiento con CO₂ induce una disminución de putrescina y una mayor acumulación de espermidina y espermina, sin ningún efecto sobre la arginina descarboxilasa, así como una transformación de putrescina en espermidina y espermina. A temperaturas que inducen los DF el aumento de la actividad ACC-oxidasa se inhibe y la velocidad máxima de la arginina descarboxilasa aumenta.

La combinación baja temperatura y altas concentraciones de CO₂ conduce a la producción de etileno basal mientras que la actividad ACC-oxidasa no cambia. En los frutos tratados con CO₂ la ausencia de producción autocatalítica de etileno, dependiendo de la temperatura, puede deberse a una desviación de la S-adenosilmetionina hacia la síntesis de poliaminas, primeramente espermidina y espermina (Muñoz *et al.*, 1999).

Para intentar disminuir, retrasar e incluso evitar el desarrollo de los daños por frío, se pueden aplicar algunas tecnologías que se han indicado precedentemente; Sin embargo en chirimoya son escasos los trabajos que abordan específicamente este objetivo, centrándose más en los efectos sobre la maduración y en prolongar la conservación a temperaturas que no induzcan los daños por frío.

Así en atmósferas controladas con diferentes concentraciones de O₂/CO₂, la correspondiente a 2%/10% era la que mejor mantenía la calidad durante 22 días en almacenamiento refrigerado, con una pérdida menor de peso y de textura que los frutos conservados en atmósfera normal. Por el contrario no se han encontrado diferencias entre la acidez, azúcares, y tasa respiratoria entre las distintas condiciones ensayadas (Plaza *et al.*, 1979).

Sobre la variedad "Concha lisa" se han ensayado varias atmósferas con objeto de diseñar una atmósfera modificada que permita prolongar las posibilidades de conservación y transporte. Cuando disminuye la concentración de O₂ hasta niveles del 10% se aprecia un retraso en la aparición de la crisis respiratoria, que desaparece, al igual que el máximo etilénico, al disminuir la concentración de O₂ al 5%. Los frutos maduran normalmente cuando se transfieren a la atmósfera normal, sin embargo el tiempo que transcurre difiere con el tratamiento y es inversamente proporcional al contenido de O₂. El retraso del climaterio a 5% de O₂, unido a la posibilidad de madurar cuando se transfieren a la atmósfera normal, hacen de esta concentración aceptable para la conservación bajo AM o AC (Palma *et al.*, 1993).

Con atmósferas controladas con el 3% de O₂ en combinación con niveles de CO₂ que oscilan entre el 0 % y 6% de CO₂, se ha comprobado que la disminución de la respiración,

azúcares y ácidos se debe a los niveles bajos de O₂, mientras que la disminución de etileno y textura está inducida por la alta concentración de CO₂ (Alique y Oliveira, 1994).

Niveles del orden del 10% de O₂ con concentraciones elevadas de CO₂, oscilando entre el 10 y 20% inhiben la actividad de las invertasas solubles y de pared celular y reducen la acumulación de azúcares y ácido málico. Por el contrario esta combinación gaseosa no tiene efecto sobre el ácido cítrico y el aumento de la concentración de fumárico, que se encuentra relacionada directamente con los niveles de CO₂. A pesar de que a partir del día 9 se detectan diferencias en la textura entre la AC y la normal, no se ha podido dilucidar el papel que juegan las poligalacturonasas y carboximetilcelulasas (Sánchez *et al.*, 1998).

La utilización de atmósferas hipobáricas durante la maduración a 12°C pone de manifiesto que la textura se mantiene significativamente más elevada que en los controles, mientras que el contenido proteico fue menor. El almacenamiento en atmósferas hipobáricas permite retrasar la maduración durante 4 semanas sin alteración significativa de las características organolépticas. La utilización de sulfito sódico, a diferentes concentraciones, hace que la pérdida de textura sea menor durante la maduración y esta es proporcional a la concentración de sulfito. Este compuesto inhibe la actividad PPO (polifenol oxidasa) tanto en la pulpa como en la piel y a concentraciones del 1% induce la aparición de sabores anómalos (Plata *et al.*, 1987).

La conservación en atmósferas modificadas (10% O₂ y 10/15/20% CO₂) durante periodos cortos de tiempo (3/6/9 días) a 8°C modifican la maduración cuando son transferidos a 20°C. Con respecto a los controles los frutos tratados con CO₂ reducen la producción de etileno, la velocidad de la pérdida de textura y retrasa la maduración. Por el contrario no se aprecian marcadas diferencias en la respiración y acumulación de azúcares durante la maduración (Alique, 1995).

Tratamientos cortos con altos niveles de CO₂ afectan a la maduración cuando las chirimoyas son transferidas a 6°C, manteniendo un efecto residual prolongado y amplía la vida comercial útil previniendo el ablandamiento del fruto y retrasando el inicio de la senescencia (Escribano *et al.*, 1997).

Mientras que en el almacenamiento al aire a temperatura ambiente el contenido de clorofila disminuye en la piel, así como una disminución de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (LRS) y un aumento de la poligalacturonasa (PG), en la conservación en altas concentraciones de CO₂ se mantiene el contenido de clorofila, y se retrasa la pérdida de textura y el máximo de la acumulación de proteínas relacionadas con la poligalacturonasa y se mantienen los niveles de LRS (Del Cura *et al.*, 1996).

Con niveles muy bajos de O₂, del orden del 3%, se observa un gradiente de ablandamiento de la pulpa entre la zona ecuatorial y apical, y se ve aumentado con bajas concentraciones de O₂ y altos de CO₂, teniendo también un efecto importante sobre el

ablandamiento de la piel. Parece ser que el efecto de la AC en la prevención del ablandamiento es mayor en los tejidos menos maduros que en los que se encuentran más maduros. También se ha observado que la AC retrasa o inhibe los cambios de calidad del fruto que se ponen de manifiesto durante el almacenamiento al aire: aumento de los sólidos solubles, acidez, amarillamiento de la pulpa y disminución de la luminosidad (Zamorano *et al.*, 1999).

Se ha estudiado la influencia que las atmósferas con niveles altos de CO₂ tienen sobre la actividad PAL (fenilalanina amonio liasa) y el contenido de fenoles durante la maduración, encontrando que no mejora la actividad del enzima ni la acumulación de lignina, aunque los frutos tratados tienen un mayor contenido de lignina cuando son transferidos al aire. Parece ser que la actividad PAL es responsable de la síntesis de importantes compuestos metabólicos durante los eventos iniciales de la maduración (Assis *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2002).

Se ha observado un incremento en la acumulación de lignina y la actividad PAL cuando se conserva durante periodos largos a bajas temperaturas, así como la acumulación de putrescina y el alza de la actividad ADC (arginina descarboxilasa). El pretratamiento con CO₂ evita la rigidez del fruto y detiene el aumento de PAL y la acumulación de lignina, así como el retraso de la subida de putrescina y de la actividad ADC (Escribano *et al.*, 2003).

Se ha descrito que en la rápida pérdida de textura de la chirimoya participa la xiloglucano endotransglicosilasa (XET) y la expansina (EXP). A pesar de que el tratamiento con 1-MCP retrasa el ablandamiento no está todavía claro su relación con la expresión de los genes XET y EXP (Li *et al.*, 2009).

Los tratamientos con vapor atomizado de agua caliente entre 46° y 54°C durante 60 minutos pueden tener efectos positivos o negativos en función de la temperatura. Así a 46°C la variedad "Fino de Jete" acelera la maduración, estimulando la respiración, e induciendo el inicio de la producción de etileno y la degradación de almidón. Por el contrario a 48°C se observa un retraso en todos esos procesos y en el metabolismo de los hidratos de carbono, lo que supone aumentar la vida comercial útil de la chirimoya. Es importante destacar que cuando la temperatura supera los 52°C el bloqueo de la maduración es irreversible (Alique *et al.*, 2009).

La conservación a temperaturas inductoras de los daños por frío reducen la hidrólisis del almidón y consecuentemente la concentración de monosacáridos, aunque cuando se transfieren los frutos a temperatura ambiente se vuelve a activar la degradación del almidón, pero los niveles de glucosa y fructosa son menores que los alcanzados en la maduración normal y su concentración depende de la intensidad de los daños por frío (Gutiérrez *et al.*, 1994).

Cuando se almacenan los frutos en atmósferas del 30% de CO₂ durante cortos periodos de tiempo se induce la expresión de proteínas en la pulpa con características de proteínas de estrés. El CO₂ retrasó la maduración sin alterar los valores finales de sólidos solubles, pH y glucosa y fructosa, que fueron similares a los controles madurados a 20°C en aire. Del mismo modo el almacenamiento a 4°C durante 24 horas induce la síntesis de proteínas con alta homología con γ HSP_s de otras especies vegetales (Sevillano, 2007).

La maduración de la chirimoya es típicamente climatérica, con una crisis etilénica intensa y muy corta, la tasa respiratoria tiene lugar antes y algunos autores sostienen que hay una segunda tras el máximo etileno, si bien parece ser que esta posibilidad no se observa en todas las variedades.

Esquemáticamente se pueden resaltar los siguientes aspectos:

- En poscosecha la maduración tiene lugar en un periodo de tiempo muy corto, por lo general no más de 7/9 días, lo que dificulta y limita su comercialización.
- Todos los estudios que se han realizado sobre las modificaciones que experimenta la chirimoya durante la maduración han sido en poscosecha a temperatura ambiente. La determinación del momento de recolección no está exenta de dificultades y lógicamente puede influir sobre el comportamiento posterior del fruto. Tal vez se podría tener una información más realista de los procesos que tienen lugar en la maduración si se recolectan los frutos durante el crecimiento tomando como fecha de referencia el momento del cuaje del fruto.
- Los procesos más característicos de la maduración de la chirimoya son:
 - A) la degradación del almidón, acumulado en la etapa preclimatérica, en azúcares simples como glucosa y fructosa.
 - B) un aumento de la acidez, hecho no muy habitual en los frutos climatéricos.
 - C) una disminución muy acusada de la textura. Aunque no se ha estudiado en profundidad parece ser que la puesta en marcha de estos procesos no vienen determinados por la síntesis autocatalítica del etileno, ya que tienen lugar antes que esta se produzca.
- La elevada sensibilidad a los daños por frío ha motivado que se realicen ensayos, aunque no muy numerosos, para desarrollar técnicas que limiten o retrasen el desarrollo de los DF. Al no poder almacenar los frutos a temperaturas inferiores a los 10°-12°C el periodo de conservación se acorta sensiblemente.

- De las diferentes técnicas ensayadas destacan las que modifican la atmósfera que rodea al fruto, ya sea la atmósfera controlada o modificada. Aunque se han realizado diferentes ensayos, estos se han dirigido al estudio de cambios bioquímicos de algunos compuestos y enzimas, sin abordar los aspectos que implican una mejora en el nivel de los daños por frío.
- La sensibilidad y la intensidad de los DF depende de la variedad y, se puede ver afectada la apariencia del fruto y la maduración o las características sensoriales.
- A pesar de ser un fruto climatérico no se ha estudiado como participa el etileno en el desencadenamiento y la sensibilidad a la fisiopatía.
- No se ha investigado suficientemente como afecta a la maduración y a los daños por frío, la inhibición de la síntesis de etileno cuando se conservan los frutos a bajas temperaturas.

Objetivos

2.- OBJETIVOS

Como se ha puesto de manifiesto, los daños por frío (DF) en los frutos, independientemente de que éstos sean o no climatéricos, tienen algunos síntomas similares a los que se presentan durante el proceso de maduración, como las alteraciones en la estructura y composición de las membranas y el estrés oxidativo asociado a dichas alteraciones. Dado que en los frutos climatéricos la mayoría de los procesos relacionados con la maduración están regulados por el etileno, se ha propuesto la hipótesis, no contrastada, de la participación del etileno en el desarrollo de los DF. En el caso de los frutos no climatéricos, aunque el etileno no interviene en el desencadenamiento y desarrollo de la maduración, podría también tener un efecto inductor de los DF en las especies sensibles, ya que el deterioro también se inicia por la degradación de las membranas celulares.

Hay un hecho que tiene lugar, en mayor o menor intensidad, en ambos tipos de frutos, y es que en la mayoría de las ocasiones esta fisiopatía se desarrolla tras la exposición de los frutos a temperatura ambiente, produciéndose un aumento de la síntesis de etileno, que podría interpretarse como una respuesta de defensa frente a las bajas temperaturas o, por el contrario, que pudiera ejercer un efecto inductor de los DF en las especies sensibles. Para dilucidar el papel del etileno, se han realizado tratamientos con etileno o compuestos que inhiben su producción, aunque de momento los resultados son contradictorios. Por un lado, si el etileno se sintetiza como respuesta a los daños por frío, podría modificar el estado oxidativo de los frutos y, por otro, si se bloquea la producción de etileno, es razonable pensar que como resultado se logrará una resistencia a la aparición de los daños.

El objetivo general del presente trabajo es estudiar el desarrollo de los daños por frío en calabacín y chirimoya, frutos no-climatérico y climatérico, respectivamente, y analizar la incidencia de tratamientos con etileno y 1-metilciclopropeno (1-MCP, inhibidor de su síntesis), sobre el desencadenamiento y desarrollo de los daños por frío. Por ello se investigarán los efectos de las bajas temperaturas sobre los daños por frío y la evolución de los mismos cuando los frutos son transferidos a temperatura ambiente. Así mismo, se estudiarán los efectos de los tratamientos con etileno y 1-MCP aplicados antes de la conservación a bajas temperaturas, sobre el desarrollo de los DF.

En los diferentes objetivos específicos se estudiará la sintomatología de los DF, modificaciones de compuestos característicos de la calidad, estrés oxidativo de las membranas celulares y mecanismos antioxidantes de defensa enzimáticos y no enzimáticos.

Materiales y Métodos

3.1.- MATERIAL VEGETAL

3.1.1.- Calabacín

Los calabacines (*Cucurbita pepo* L.) de la variedad "Elite" fueron recolectados en un invernadero del Campo de Cartagena y transportados inmediatamente a nuestro laboratorio y seleccionados según tamaño (aproximadamente 35 mm de diámetro), color (amarillo para los que se encontraban en estado de madurez comercial; ó verde-amarillento para los semiverdes), con una calidad óptima y ausentes de defectos superficiales (Fotografía 3.1).



Fotografía 3.1.- Estado de los calabacines en el momento de la recolección.

3.1.2.- Chirimoya

Las chirimoyas (*Annona cherimola* Mill.) de la variedad "Fino de Jete" fueron recolectadas en un huerto de una Cooperativa en Almuñecar (Granada) en un estado preclimatérico. Los frutos fueron seleccionados según tamaño y color, con una calidad óptima y ausentes de defectos superficiales (Fotografía 3.2).



Fotografía 3.2.- Estado de las chirimoyas en el momento de la recolección.

3.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1.- Calabacín

Una vez recolectados los frutos, se transportaron inmediatamente al laboratorio donde fueron de nuevo seleccionados, clasificados y distribuidos en lotes; cada lote estaba compuesto de tres muestras. Cada muestra se compuso de tres submuestras constituidas por dos frutos cada una, en total seis frutos por muestra y 18 frutos por lote. Como se muestra en la **Figura 3.1**, tras la recepción de los frutos en el laboratorio, se separó una muestra que se analizó ese mismo día (muestra Día 0) y que se empleó como referencia del estado inicial de los calabacines. El resto de frutos se distribuyó en cuatro lotes: un lote fue conservado a temperatura de no daño (lote control a 10°C), y los otros tres lotes fueron conservados en refrigeración (1°C), de estos últimos, uno sirvió como control de daños por frío y a los otros dos se les aplicaron tratamientos con etileno y 1-MCP previos a la conservación en frío.

El tratamiento con etileno se hizo a dosis de 50 ppm durante 48 horas, durante este tratamiento los frutos se introdujeron en un recipiente de metacrilato herméticamente cerrado en el que se introdujo un recipiente con KOH para atrapar el CO₂ producido durante la respiración de los frutos. Tras 24 horas de tratamiento, para evitar que los calabacines entrasen en anoxia, se abrió el recipiente durante el tiempo suficiente y, después se continuó con el tratamiento hasta las 48 horas. El tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP) se hizo a dosis de 2 ppm durante 24 horas. Durante la aplicación de los tratamientos con etileno y 1-MCP, los lotes control (10°C y 1°C) se mantuvieron en las mismas condiciones de humedad y temperatura que los lotes que estaban siendo tratados. Tras la aplicación de los tratamientos, todos los frutos (tratados y control) fueron conservados en cámaras de temperatura y humedad controlada a 1° ó 10°C y se realizaron muestreos periódicos.

Al cabo de 5, 12 y 19 días de conservación, se sacaron los frutos de las cámaras y se realizaron diversos análisis en el fruto entero: peso, índice de daños por frío y producción de etileno. Seguidamente estos frutos analizados se transfirieron a cámaras a 20°C (reacondicionamiento) durante dos días para simular la cadena comercial. Transcurrido el tiempo total de conservación de 7, 14 y 21 días, se volvieron a realizar los análisis anteriores (peso, índice de daños por frío y producción de etileno) y además se analizó el color de la piel y el porcentaje de salida de electrolitos en piel y pulpa. El resto del material vegetal fue troceado, separando la piel de la pulpa, congelado con N₂ líquido, liofilizado y conservado a -70°C hasta la realización de los siguientes análisis en piel y pulpa: peroxidación lipídica (MDA), fenoles totales, ácido ascórbico libre, contenido en

equivalentes de trolox (TEAC), y actividades enzimáticas antioxidantes: catalasa y peroxidasa.

La muestra del Día 0 fue sometida a los mismos análisis que el resto de los frutos al finalizar la conservación a 20°C. En la **Figura 3.1** se recoge esquemáticamente el diseño de la experiencia y los análisis realizados en las diferentes partes del calabacín.

3.2.2- Chirimoya

Cuando los frutos llegaron al laboratorio se seleccionaron, se clasificaron y se distribuyeron en lotes de tres muestras, constituidas cada una de ellas por tres submuestras de tres frutos cada una (**Figura 3.2**). El mismo día de recepción se separó una muestra compuesta de tres submuestras con tres frutos (muestra Día 0) y que se empleó como referencia del estado inicial de las chirimoyas a lo largo de toda la experiencia. El resto de los frutos se distribuyeron en cuatro lotes, dos lotes control y dos lotes tratados. Los tratamientos aplicados fueron 150 ppm de etileno durante 48 horas y 5 ppm de 1-MCP durante 24 horas. La aplicación de los tratamientos fue la misma que la descrita para los calabacines. De los dos lotes control, uno fue conservado a 4°C, temperatura que ocasiona daños por frío, y el otro a 12°C que se consideró el control para la evolución de la maduración.

Transcurridos 4, 7 y 11 días se procedió a la extracción de muestras realizando los siguientes análisis al fruto entero: peso, índice de los daños por frío y producción de etileno. Seguidamente la muestra analizada fue reacondicionada a 20°C durante 24 horas, para simular la cadena comercial y evaluar el estado de los frutos y el avance de su maduración. Transcurrido ese tiempo, que supone respectivamente 5, 8 y 12 días de conservación total, se volvieron a repetir los análisis anteriores al fruto entero (peso, índice de los daños por frío y producción de etileno) y además se determinó, en la piel, la salida de electrolitos y color, y en la pulpa, los sólidos solubles totales, la acidez valorable y el pH.

El resto del material vegetal se fraccionó en pulpa y piel, fueron troceados, congelados con nitrógeno líquido, liofilizados y conservados a -70°C hasta los análisis posteriores. Sobre ambos materiales se realizaron los siguiente análisis: peroxidación lipídica (MDA), fenoles totales, ácido ascórbico libre, contenido en equivalentes trolox (TEAC) y actividades enzimáticas antioxidantes: catalasa y peroxidasa. El muestreo correspondiente al Día 0 se sometió a los mismos análisis que el resto de los frutos al finalizar la conservación a 20°C.

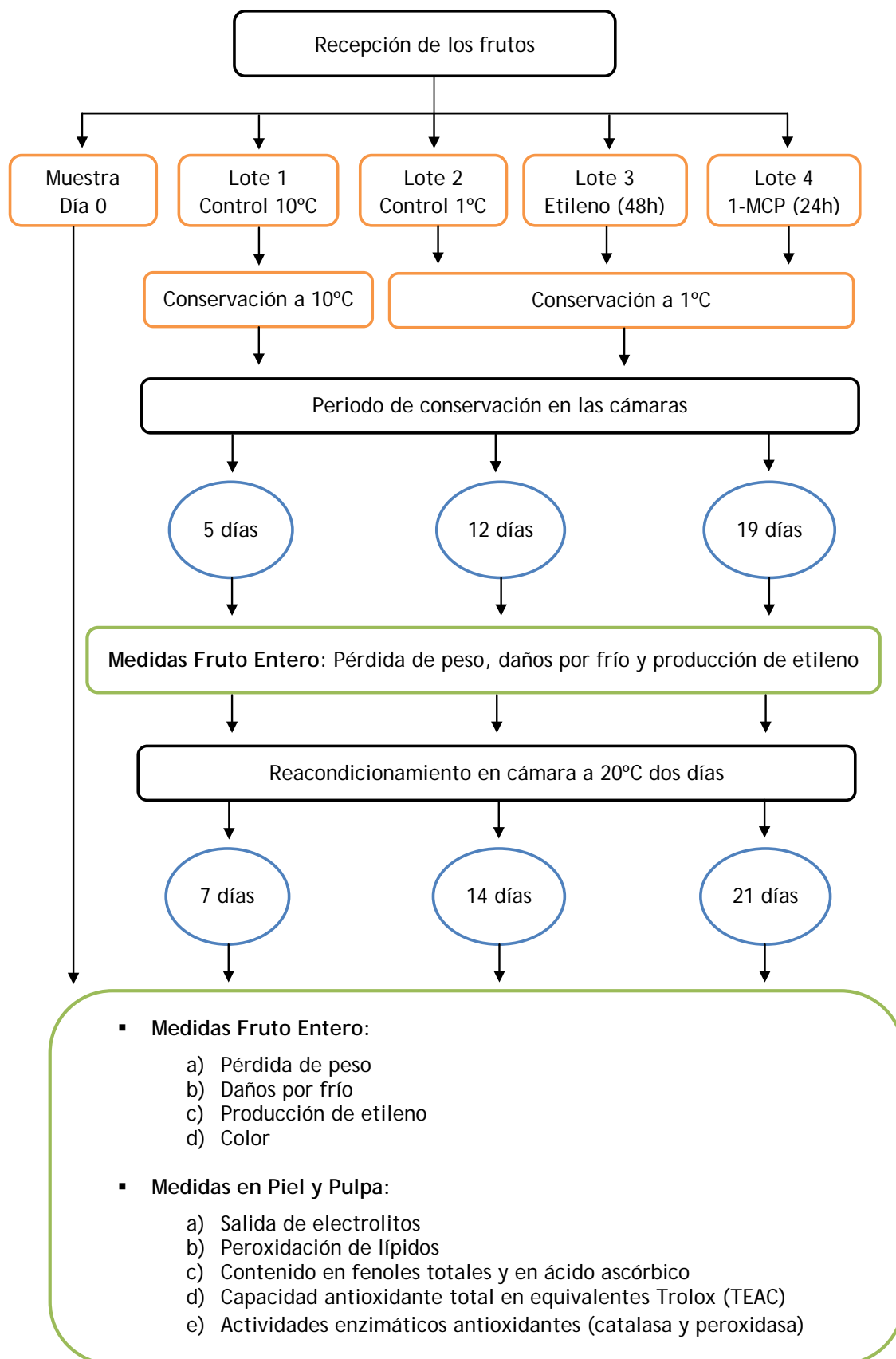


Figura 3.1. - Diseño experimental para calabacín.

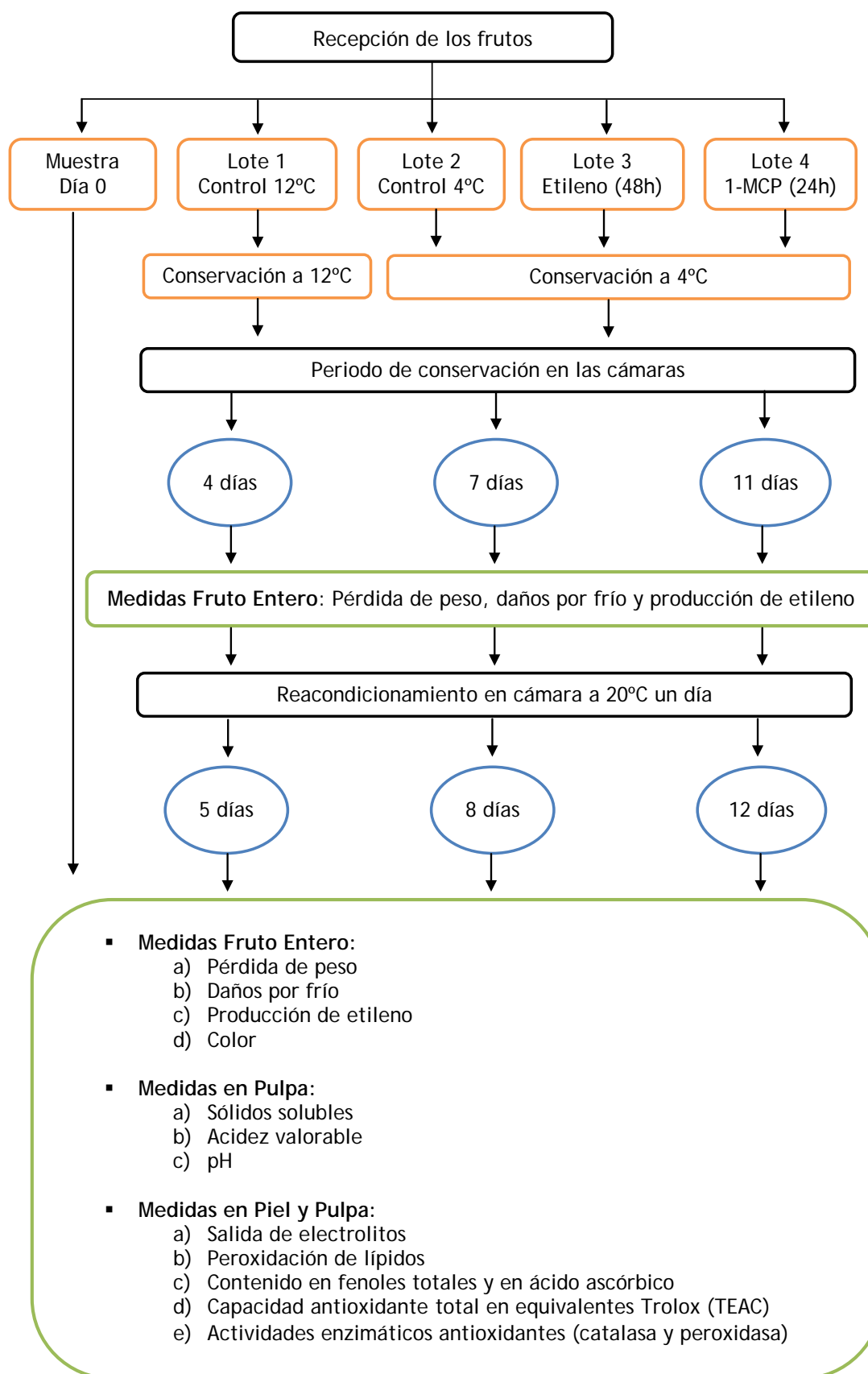


Figura 3.2.- Diseño experimental para chirimoya.

3.3.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.3.1.- Análisis fisicoquímicos y fisiológicos

3.3.1.1.- Pérdida de peso

Para la medida del peso se utilizó una balanza Sartorius 6000 con una precisión de $\pm 0,01g$. La pérdida de peso se calculó a la salida de la cámara fría y de $20^{\circ}C$. La pérdida de peso durante la conservación se expresó como porcentaje (%). El resultado representa la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

3.3.1.2.- Daños por frío

La intensidad de los daños por frío se calculó a partir de valores asignados en la evaluación visual de los frutos, de acuerdo con una escala establecida para valorar la extensión de la superficie afectada (Martínez-Tellez y Lafuente, 1997) (Fotografía 3.3).



0%- Ausencia daños



25%- Daños leves



50%- Daños pronunciados



75%- Daños graves



100%- Fruto totalmente afectado

Fotografía 3.3. Escala de Índice de daños ocasionados por el frío (0-100 %) en calabacín.

Esta escala abarca 5 posibles estados, desde ausencia de daños, con un valor del 0%; daños leves, con un 25%; pronunciados, con 50%; daños graves, con un 75% y el 100% si el fruto está totalmente afectado (Fotografía 3.3). El resultado representa la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

3.3.1.3.- Sólidos solubles totales, acidez valorable y pH, en pulpa de chirimoya

El contenido en sólidos solubles totales se determinó a 20°C en un refractómetro digital PR-101 de Atago. El refractómetro se calibró con agua destilada y después se depositó en el prisma una alícuota de la papilla del mesocarpio. Se leyó el índice de refracción y los resultados se expresaron en grados Brix. Para la determinación de la acidez total valorable se realizó una valoración ácido-base con NaOH 0,1 N hasta pH final de 8,1. Se utilizó un valorador automático Metrohm 665 Dosimat equipado con un procesador Metrohm 686 Titroprocessor. Los resultados se expresaron en gramos de ácido málico contenidos en 100 gramos de peso de pulpa frescos (g/100 g PF). Los resultados representan la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas.

3.3.1.4.- Producción de etileno

Para la determinación de la producción de etileno, se introdujeron seis frutos en recipientes herméticamente cerrados, de volumen conocido, y provistos de un septum de silicona en la parte superior. Al cabo de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se extrajo con jeringa a través del septum, 1 mL de la atmósfera interna del recipiente para la determinación de etileno. Se extrajeron tres medidas por cada una de las tres submuestras de cada muestra.

El etileno se cuantificó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo HP 5890, provisto de un detector de ionización de llama (FID) y un registrador Hewlett-Packard modelo HP3390A. Se utilizó una columna de acero inoxidable de 3 m de longitud y 1/8" de diámetro interno, con relleno de alúmina activada de 80/100 mallas. Los flujos del gas portador (nitrógeno), de hidrógeno y de aire fueron 32, 36 y 40 mL/min, respectivamente, y las temperaturas de la columna, inyector y detector 70, 150 y 175°C, respectivamente. La cuantificación se realizó mediante el método de calibración punto a punto con un estándar externo de 10 ppm de etileno. Los resultados se expresaron como nanolitros de etileno producido por gramo de peso fresco y hora (nL/g.h). El resultado de la producción de etileno representa la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

3.3.1.5.- Color de los frutos

El color se midió mediante los parámetros de color por reflexión utilizando el espacio de color CIE-L*a*b (Figura 3.3.), con un colorímetro Minolta CR-300 calibrado con un estándar blanco. Se obtuvieron las coordenadas espaciales de color en el sistema CIE L*, a*, b*. En este sistema del color pueden distinguirse el tono, la calidad y el croma (saturación), convirtiendo los colores en valores numéricos. La claridad es L*, desde la reflexión nula (L = 0) a una reflexión difusa perfecta (L = 100), mientras que la cromaticidad (tono y croma) es indicada por a* y b* conjuntamente. El parámetro a*, representa el eje que va desde los colores verdes (- a*) hasta colores rojos (+ a*). Por su parte, b* representa el eje que evoluciona desde el azul (- b*) hasta colores amarillos (+ b*). Cada color viene dado por tres valores de estas coordenadas, que representan un punto en el espacio tridimensional (Figura 3.3).

La determinación del color se realizó individualmente en los frutos que constituían cada muestra. Las medidas se tomaron sobre la piel de las dos caras del fruto y el resultado representa la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

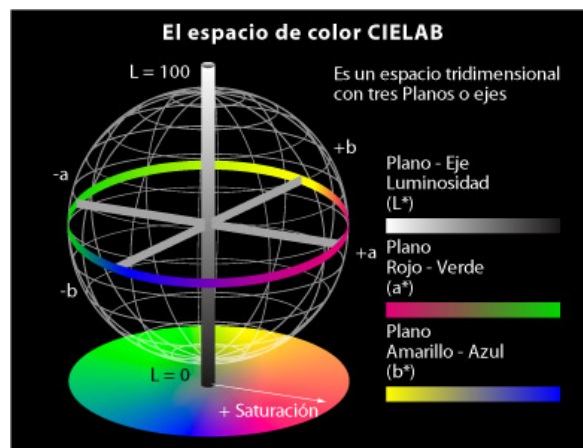


Figura 3.3.-Diagrama del espacio de color CIELAB

3.3.2.- Análisis del estado oxidativo de las membranas

3.3.2.1.- Salida de electrolitos

La salida de electrolitos se midió en la piel y en la pulpa del calabacín y en la piel en chirimoya. Para la determinación de la salida de electrolitos (Ben-Amor *et al.*, 1999) se extrajeron 5 cilindros, de 0,5 cm² de diámetro, de caras opuestas de cada uno de los frutos que constituían una muestra. A los 10 discos de cada submuestra se adicionó 40 mL de manitol 0,4 M. La mezcla se mantuvo en agitación a 120 ciclos por segundo durante 3 horas. A continuación se midió la conductividad de la solución (EC₀) en un conductímetro digital micro CM2200. La conductividad total (EC_T) se midió cuando el tejido fue degradado completamente después de congelarlo durante 24 h a -20°C y someterlo a 121°C durante 20 minutos en autoclave. La salida de electrolitos del tejido se expresó como porcentaje de conductividad potencial (%EC), el resultado representa la media ± SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

3.3.2.2.- Índice de peroxidación lipídica (MDA)

La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados puede ser analizada por medio de la cuantificación de malondialdehído (Poovala *et al.*, 1999), cuya formación se considera como un indicador de lipoperoxidación ya que es uno de los productos resultantes de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular (Lysiak *et al.*, 2002). Por lo tanto, altas concentraciones de este compuesto indican un aumento en la peroxidación.

La peroxidación lipídica se midió en la piel y pulpa del calabacín y en la piel de la chirimoya. Se tomaron 0,20 gramos de tejido liofilizado y se mezclaron con 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 M. A continuación se homogeneizó en Vortex y se centrifugó a 17400 × g durante 35 min, se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se adicionó 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% disuelto en TCA al 20%. Esta disolución se incubó en baño a 90°C durante 30 minutos, tras lo cual se introdujo durante 5 minutos en un baño de hielo para detener la reacción de formación del complejo MDA-TBA. A continuación se centrifugó la disolución a 17400 × g durante 10 minutos a 4°C, e inmediatamente después se separó 1 mL del sobrenadante para medir su absorbancia a 532 nm y restando la absorbancia no específica a 600nm, utilizando como referencia el reactivo TBA al 0,5% en TCA al 20%. La concentración de MDA se calculó utilizando su coeficiente de extinción molar 155.000 M⁻¹.cm⁻¹. (R, Heath y L, Packer, 1968).

Se realizó una extracción de tejido por submuestra. Los resultados se expresaron como nanomoles de MDA producidos por gramo de peso fresco (nmol MDA/g PF) y representan la media ± SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

3.3.3.- Análisis del estado oxidativo de los frutos

3.3.3.1. Extracción para la determinación del contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante total (TEAC)

Para la preparación de las extracciones a 0,12 g del material liofilizado se le añadió 5 mL de tampón fosfato salino (PBS) 50 mM, pH=7,8 y se agitó durante 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó la solución a 1006 × *g* durante 40 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que fue alicuotado y conservado a -70°C

3.3.3.1.1.- *Medida del contenido en fenoles totales*

El método empleado fue el descrito por Wood *et al.*, (2002), con ligeras modificaciones. Este método se basa en la medida de la absorbancia para la posterior comparación con una recta de calibrado construida con las medidas de absorbancia correspondientes a distintas concentraciones de un patrón de contenido en fenoles totales conocido. En este caso, el patrón empleado fue el ácido gálico.

Se prepararon 3 tubos de ensayo por cada muestra y uno para la preparación del blanco. En cada uno de los tubos, se diluyeron 100 µL del extracto correspondiente, en 400 µL de tampón fosfato 50 mM, pH=7,8 (a excepción del blanco que estaba constituido únicamente por 500 µL tampón fosfato). Estas disoluciones, fueron oxidadas con 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10. Al cabo de 8 minutos, la reacción fue neutralizada con 2 mL de Na₂CO₃ (75 g/L) y se introdujeron los tubos de ensayo durante 5 minutos en un baño a 50°C. Finalmente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro visible/UV Helios α (Termo Electrón Corporation). Los resultados se expresaron como mg ácido gálico/ 100 g de peso seco y representan la media ± SD de todas las determinaciones realizadas por muestra

3.3.3.1.2.- *Medida de la capacidad antioxidante total en equivalentes de Trolox (TEAC)*

Este ensayo se fundamenta en la generación del radical anión ABTS^{•-} a partir de una mezcla reactiva constituida por 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorídrico (ABAP) y 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS²⁻) (Van den Berg *et al.*, 1999). La solución radical posee un color verde característico que puede ser detectado espectrofotométricamente a 734 nm y cualquier sustancia adicionada al medio, capaz de capturar dicho radical, originará una disminución de absorbancia a dicha longitud de onda.

El objetivo del ensayo es comparar la capacidad antioxidante total de una muestra problema con la actividad antioxidante total del Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), en función de la capacidad de captación del radical ABTS^{•-}. Finalmente a la

muestra se le asignará un valor TEAC que representa la concentración (μM) de una solución Trolox que poseería una capacidad antioxidante igual a la de la muestra analizada.

La mezcla radical se preparó a partir de las soluciones stock 2,5 mM ABAP y 20 mM ABTS^{2-} , en solución tampón (100 mM fosfato y 150 mM NaCl, pH 7,4). La mezcla se incubó, protegiéndola de la luz, a 60°C , hasta obtener una absorbancia a 734 nm entre 0,35 y 0,45 unidades de absorbancia. Posteriormente se almacenó a temperatura ambiente. La actividad antioxidante se determinó añadiendo 40 μL de la muestra problema a 1,960 μL de la solución radical, midiendo la absorbancia a 734 nm tras un periodo de 6 min.

Para la obtención de los valores TEAC se preparó una recta de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox en el rango de 0 a 10 μM , midiendo el incremento de la absorbancia (ΔAbs) después de 6 min con la mezcla radical.

$$\Delta\text{Abs}_{\text{Trolox}} = \text{Abs}_{\text{Trolox (t=6min/12h)}} - \text{Abs}_{\text{Solvente (t=6min/12h)}}$$

El coeficiente de regresión (cr) se calculó a partir de la recta de calibración:

$$\Delta\text{Abs}_{\text{Trolox}} = \text{cr} \times [\text{Trolox}]$$

El valor TEAC de las muestras analizadas se obtuvo dividiendo el incremento de la absorbancia de la muestra entre el coeficiente de regresión. Los resultados se expresaron en concentración de Trolox (μM) que representa el valor TEAC.

$$\text{TEAC} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{problema}}}{\text{cr}} \right)$$

3.3.3.2.- Determinación de ácido ascórbico libre

La determinación de este parámetro se realizó siguiendo el método descrito por Wimalasiri y Wills (1983) con leves modificaciones. Para la extracción del ácido ascórbico, a 0,25 gramos de muestra liofilizada y congelada a -70°C , se adicionó un volumen de 10 mL de ácido metafosfórico al 5% (p/v). El homogeneizado se centrifugó a $7000 \times g$ durante 30 min en una centrífuga refrigerada a 4°C (Digiten 20-R, Ortoalresa). El sobrenadante se hizo pasar a través de una gasa de muselina y se almacenó a -70°C hasta llevar a cabo la purificación y la determinación del ácido ascórbico. Se prepararon 3 extracciones por cada

una de las tres submuestras. La purificación del extracto congelado se realizó en dos etapas. Primero se hizo pasar a través de un filtro Millipore de 0,45 μm de tamaño de poro, para eliminar las impurezas de mayor tamaño y posteriormente se purificó a través de un filtro C18 Sep-Pack plus para eliminar los componentes fenólicos y lipofílicos.

La cuantificación de ácido ascórbico se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con un cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10Atvp equipado con un inyector de lazo de 20 μL , un detector de UV-VIS modelo SPD-10Avvp. Se empleó una columna de intercambio iónico ION-300 de 30 cm de longitud y 7,8 mm de diámetro interno (Interaction Chromatography™ Inc.), termostaticada a 30°C. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 5 mM con elución en régimen isocrático a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min.

El cálculo de las concentraciones de ácido ascórbico de las muestras, se realizó a partir de los valores de las áreas y la recta de calibrado obtenida con patrones externos de ácido ascórbico, previamente confeccionada. Los resultados representan la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra y se expresaron como miligramos de ácido ascórbico por 100 gramos de peso seco (mg /100 g PS).

3.3.4.- Análisis de sistemas antioxidantes enzimáticos

Se analizaron las actividades de las enzimas antioxidantes, catalasa (CAT), y peroxidasa (PX) captadoras de los radicales libres de oxígeno que se forman durante los procesos de senescencia de los frutos. La extracción enzimática ha sido común tanto para el análisis de las dos enzimas como para el análisis del contenido proteico, y se describe a continuación:

Extracción enzimática: La extracción y determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se efectuó en la piel y en la pulpa de los frutos. Las extracciones enzimáticas se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Amako *et al.*, (1994), con leves modificaciones. Se realizó una extracción por cada submuestra; se sometieron a homogeneización 0,04 g de tejido liofilizado con 0,2 gramos de polivinilpirrolidona (PVP) y 3 mL de solución de extracción compuesta por tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 7,8; EDTA 0,1 mM; L-cisteína 5 mM; detergente Tritón X-100 0,2% e inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Las muestras se homogeneizaron durante 30 min en frío y en oscuridad. El homogeneizado se centrifugó a 17400 $\times g$ a 4°C durante 35 min en una centrífuga refrigerada (Digiten 20-R, Ortoalresa), seguidamente el sobrenadante se hizo pasar a través de una gasa de muselina y se recogió en microtubos de 2 mL para la medida de la absorbancia que se realizó a continuación.

3.3.4.1.- Actividad catalasa (CAT)

La determinación de la actividad enzimática CAT se basó en la velocidad de desaparición del sustrato (H_2O_2) en la reacción de reducción catalizada por la enzima (Aebi, 1984). Para ello se mezclaron 100 μL del extracto enzimático con 2,9 mL de una disolución 10,6 mM de H_2O_2 en tampón fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 y se determinó la disminución de absorbancia a 240 nm con el tiempo, frente a un blanco de solución tamponada.



Los resultados de actividad se expresaron en unidades enzimáticas específicas que representan la cantidad de enzima que transforma, a 25°C, 1 μmol de H_2O_2 por min y por miligramo de proteína (UE/mg proteína). Estos resultados representan la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

3.3.4.2.- Actividad peroxidasa (PX)

La actividad PX se determinó según describen Fielding y Hall (1973). La peroxidasa es una enzima oxidoreductasa que cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno en los organismos vivos. Para ello sustrae un átomo de hidrógeno de una molécula donadora y se lo cede al H_2O_2 (receptor), el cual se transforma en H_2O (inocua). La molécula donadora tras la sustracción del átomo de hidrógeno se transforma en un nuevo radical que polimeriza rápidamente de forma espontánea y por tanto no es perjudicial para el organismo. En este ensayo se ha utilizado como molécula donadora el guayacol (2-metoxifenol), que al polimerizar forma un cromógeno marrón que puede ser detectado espectrofotométricamente a 470 nm (Figura 3.4) y cuya concentración puede ser relacionada con la actividad enzimática.

El ensayo se realizó con la adición de 50 μL del extracto enzimático a 1950 μL de una mezcla reactiva que contenía tampón fosfato potásico 25 mM, pH 7; H_2O_2 10 mM y guayacol 20 mM. El valor de la actividad enzimática se obtuvo a partir del incremento de absorbancia a 470 nm del producto de reacción frente a un blanco de solución tamponadora. La medida de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de doble haz ultravioleta-visible (Helios α , Thermo electrón corporation). Los resultados se expresaron en unidades enzimáticas específicas (UE/mg proteína), que representa la cantidad de enzima necesaria para obtener, a 25°C, 1 μmol de producto por min y por miligramo de proteína. Estos resultados representan la media \pm SD de todas las determinaciones realizadas por muestra.

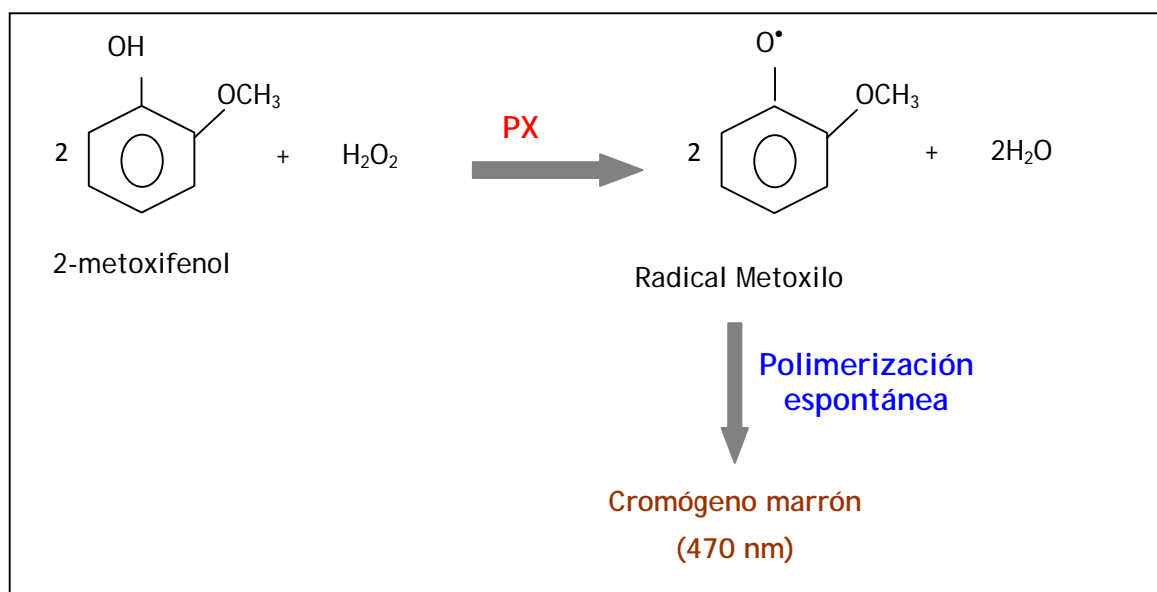


Figura 3.4. Mecanismo de acción de la enzima peroxidasa.

3.3.4.3.- Determinación del contenido proteico

La concentración proteica de los extractos enzimáticos se obtuvo espectrofotométricamente a 750 nm, mediante el Kit Bio-Rad DC protein, basado en el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La concentración de proteína de las muestras se halló de acuerdo con una recta de calibrado, calculada mediante el método de calibración de regresión lineal por mínimos cuadrados, con patrones externos de albúmina de suero bovino (ASB). Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como miligramos de proteína contenidos en 1 mL de extracto enzimático (mg/mL).

3.3.5.- Análisis estadístico

Las muestras estaban constituidas por tres submuestras de 2 frutos cada una (6 frutos) en calabacín y 3 frutos en chirimoya (9 frutos). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada submuestra, excepto en las determinaciones de color en las que cada uno de los frutos de una submuestra se analizó individualmente tomando dos medidas de cada uno. Los resultados representan, en todos los casos, las medias aritméticas \pm las desviaciones estándar de todas las medidas realizadas por muestra.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el Modelo Lineal General del paquete estadístico SPSS (versión 14.0). El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó para el tipo de tratamiento, día de almacenamiento, y temperatura de almacenamiento. Cuando las diferencias fueron significativas, las comparaciones múltiples se hicieron utilizando el test de diferencias mínimas significativas (LSD).

Resultados y Discusión

4.1.- ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS

4.1.1.- Evolución de la pérdida de peso

A pesar de que el contenido en agua en los productos agrarios es considerado primordial para mantener los frutos turgentes con una calidad aceptable, aun no se tiene un conocimiento completo sobre la relación que existe entre el estado hídrico del producto, el manejo poscosecha y las condiciones de almacenamiento. Ahora bien, el estado hídrico está definido por el contenido en agua y el potencial hídrico de los tejidos. La pérdida de agua, que tiene lugar a través de los estomas y las lenticelas de la cutícula de los frutos, se puede reducir de manera significativa en función de las condiciones de almacenamiento, temperatura y humedad relativa.

Aunque la pérdida de agua es normalmente mayor cuanto más elevada sea la temperatura, en la práctica puede suceder al revés si la cámara frigorífica carece de un buen sistema de control de humedad relativa, ya que se favorecerá la pérdida por transpiración. La temperatura de conservación también incide sobre la velocidad de respiración y por lo tanto sobre la degradación de forma oxidativa de las sustancias orgánicas para obtener moléculas más simples que puedan ser utilizadas en las reacciones de síntesis celulares y liberar energía, CO₂ y agua.

Otro aspecto que también favorece la pérdida de agua es la presencia de lesiones en la corteza del fruto, al dañar la organización de la superficie de los tejidos permitiendo un flujo gaseoso mucho más rápido a través del área dañada. Esta situación puede ser relevante en nuestro estudio, ya que los daños por frío afectan a las membranas celulares y dañan la superficie de la corteza del fruto, pudiendo favorecer las pérdidas de agua. En efecto, la deshidratación parece ser una consecuencia natural del daño por frío, y en muchos frutos como plátano y cítricos, el control de las pérdidas de humedad reduce los síntomas de esta alteración (Coney, 1989).

En el caso del fruto de calabacín, la pérdida de peso respecto al peso inicial se midió a la salida de la cámara de refrigeración y tras el reacondicionamiento a 20°C durante 2 días. En la **Figura 4.1** se muestran los valores encontrados en calabacín, a la salida de cámara a 1°C y 10°C (**Figura 4.1A**) y tras dos días a 20°C (**Figura 4.1B**), observándose una pérdida de peso intensa, que se incrementa con el periodo de conservación y con la elevación de la temperatura, aunque sea solo durante dos días.

Respecto a la pérdida de peso medida a la salida de cámara, en general los frutos almacenados a 10°C (control), presentaron mayor pérdida de peso que los frutos almacenados a 1°C durante todo el período de conservación. Tras la conservación a 10°C, la pérdida de peso de los frutos control aumentó del 5,2 ± 1,13% a los 5 días, al 12,3 ± 1,92% a los 19 días, mientras que en los frutos almacenados a 1°C, la pérdida fue menos

acusada, siendo del mismo orden en los frutos no tratados que en los tratados con etileno o 1-MCP. Las mayores diferencias entre la pérdida de peso de los frutos almacenados a 1 y 10°C se dieron a los 12 días de conservación ($p \leq 0,05$), mientras que las diferencias encontradas a los 5 y 19 días de conservación, no fueron significativas.

Tras el reacondicionamiento a 20°C, la pérdida de peso aumentó con el tiempo de conservación, estableciéndose una diferencia general con respecto a la salida de cámara a 1° y 10°C del orden de un 3% más. La principal diferencia entre la deshidratación antes y después del reacondicionamiento fue que los frutos no tratados y conservados a 1°C presentaron una pérdida de peso a los 21 días mayor que la del resto de los frutos. Este hecho podría deberse a un mayor deterioro de la corteza debido a los daños por frío, lo que favorecería la pérdida de agua. Apoyando nuestros resultados, en melón Piel de Sapo de la variedad "Sancho", sensible a los daños por frío, la pérdida de peso es superior cuando la conservación se realiza a 2°C que cuando es a 8°C, y es del mismo orden que a 20°C, lo que podría explicarse por el deterioro de la corteza como consecuencia de los DF. Por el contrario en melones de la variedad "Ruidera", menos sensibles, la pérdida de agua es similar en todos los casos (Valdenegro, 2006).

Independientemente de la influencia de los DF, la deshidratación en calabacín es un problema grave, ya que en la mayoría de los frutos, valores del 6% muestran síntomas visibles de marchitez, que deterioran la calidad y aceleran los procesos de senescencia. Wang (1994) encuentra que la pérdida de peso del calabacín alcanza valores del 7,4% y 16,8% cuando son conservados a 5°C y 15°C respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los encontrados cuando el fruto es tratado con agua caliente o choque térmico antes de la conservación a 5°C para disminuir los daños por frío. De acuerdo con esto, no es aconsejable superar un periodo de conservación de 12 días a 1°C, pues cuando los frutos fueron transferidos a 20°C, la pérdida de agua aumentó en 2% y se situó sobre el 8%. Los resultados muestran que los tratamientos con 1-MCP y etileno, no afectaron a la pérdida de agua. Pérdidas de peso similares se han puesto de manifiesto en 5 variedades de calabacín, siendo menos acusadas a 12°C que a 4° y 20°C, si bien la deshidratación de los frutos se incrementó cuando el periodo de conservación pasó de 7 a 14 días (Carvajal *et al.*, 2011).

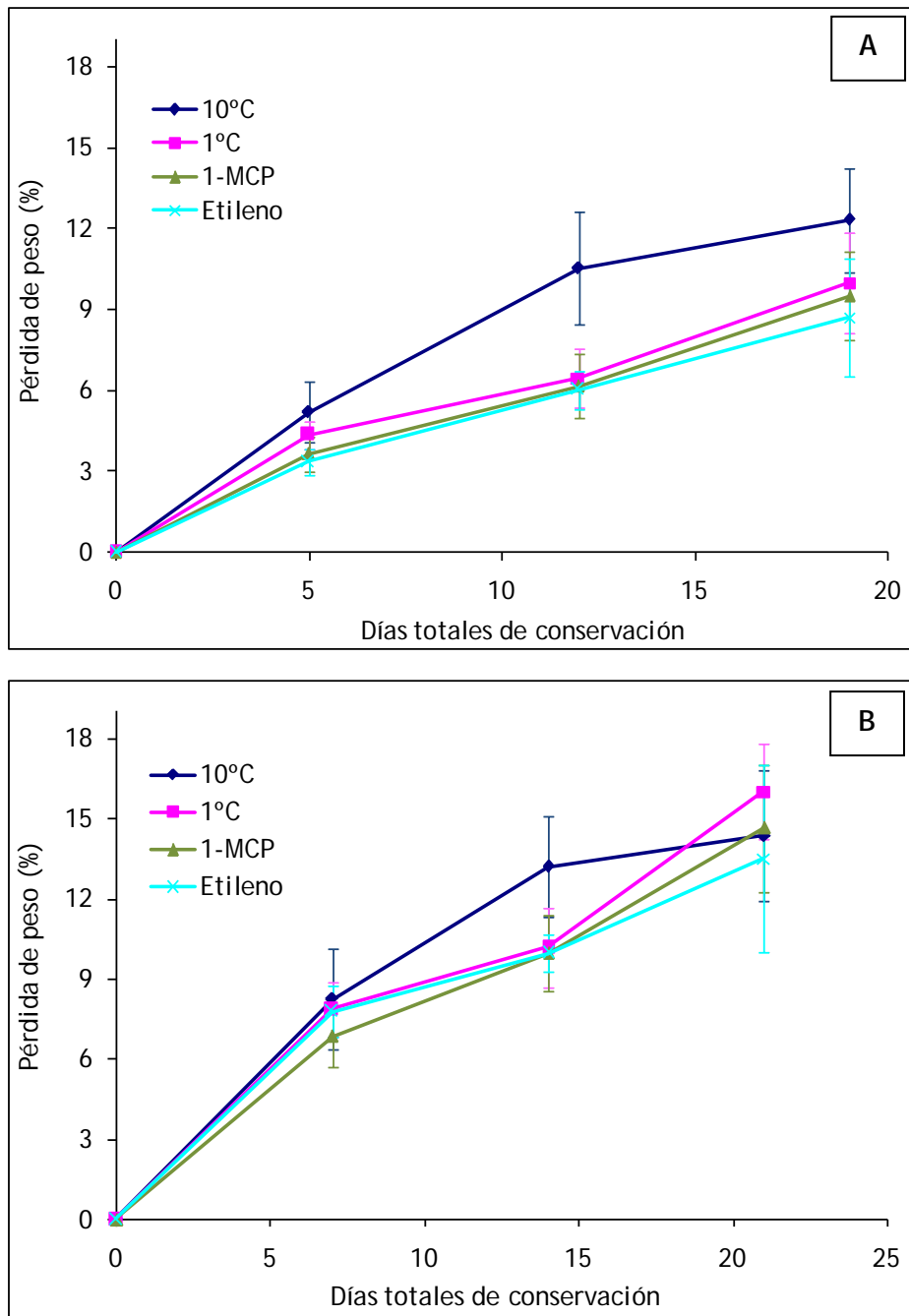


Figura 4.1. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno (A) $LSD_{0,05}=1,79$, y tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C (B) $LSD_{0,05}=2,37$ sobre la pérdida de peso. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

En la **Figura 4.2** se muestra la pérdida de peso que experimentaron las chirimoyas durante las diferentes experiencias de conservación. En este caso, la pérdida de peso respecto al peso inicial se midió a la salida de la cámara de refrigeración y tras el reacondicionamiento durante 1 día a 20°C. En la **Figura 4.2A** se recoge la pérdida de peso de los frutos almacenados a 12° y 4°C a la salida de cámara, donde se aprecian diferencias

en este parámetro del orden del 4% y un aumento casi lineal con el tiempo de conservación. Al igual que ocurría en el caso del calabacín no se aprecian diferencias de pérdida de peso entre los frutos no tratados y los tratados con etileno y 1-MCP. Tras el reacondicionamiento, la deshidratación de los frutos se incrementó, en todos los casos, en un 2-3% respecto a la pérdida de peso registrada a la salida de cámara (Figura 4.2B).

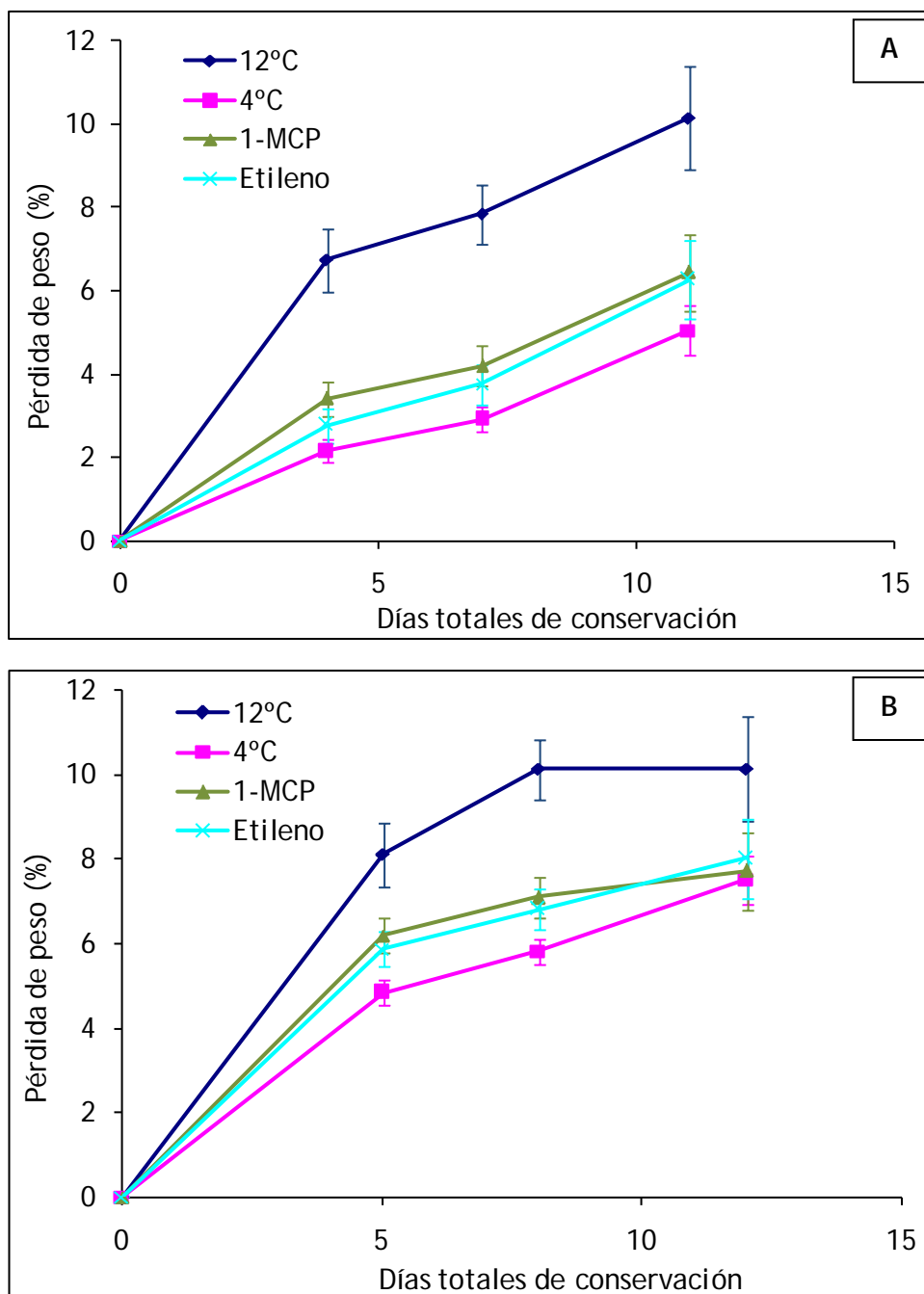


Figura 4.2. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno (A) $LSD_{0,05}=0,81$, y tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C (B) $LSD_{0,05}=0,85$ sobre la pérdida de peso. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

La pérdida de peso de los frutos conservados a 4°C fue la misma independientemente del tratamiento aplicado, lo que parece indicar que el posible retraso de la maduración por el 1-MCP o el adelanto de la misma por el tratamiento con etileno, no influyen en la pérdida de peso durante la conservación a temperaturas que inducen DF o cuando se transfieren a temperatura ambiente.

4.1.2.- Evolución de los daños por frío

En la evolución de los daños por frío influye la variedad, por lo tanto la genética, el estado de maduración, la temperatura y el periodo de tiempo de conservación al que están sometidos los frutos. Otros factores que determinan el desarrollo de esta fisiopatía son las condiciones pre cosecha previas a la conservación (Wills *et al.*, 1998). También se ha observado que hay una intensificación de los DF cuando los frutos, tras un periodo de conservación a baja temperatura, se transfieren a temperatura ambiente (Sevillano *et al.*, 2009). Dado que los síntomas que inducen los daños por frío, como las alteraciones en la estructura y composición de las membranas y el estrés oxidativo asociado, son similares a los que se presentan durante la maduración y senescencia de los frutos, se ha considerado la posibilidad que el etileno esté implicado en la inducción y desarrollo de la fisiopatía.

En los frutos de calabacín, los daños por frío se manifiestan como pequeñas depresiones, de un color ligeramente pardo, que se extienden a lo largo de toda la piel, que hacen que no sea comercializable. Por lo general la pulpa solo se ve afectada si la intensidad del daño es muy acusado, y para que esto ocurra el periodo de conservación debe ser muy prolongado (Sevillano *et al.*, 2009). De acuerdo con el criterio descrito en Materiales y Métodos, se establecieron 5 niveles de daño; ausencia de daño cuando no se detectaron depresiones en la piel (0%), daños ligeros, pronunciados, graves y totalmente afectado cuando los porcentajes de piel estaban dañados en un 25%, 50%, 75%, 100% respectivamente. Se evaluó este parámetro a la salida de cámara (**Figura 4.3A**) y tras el reacondicionamiento (**Figura 4.3B**), ya que la aparición e intensificación de los síntomas se produce en unas ocasiones durante el almacenamiento a bajas temperaturas, y en otras, al transferir los productos a temperatura ambiente (Sevillano *et al.*, 2009). Estos resultados también se pueden observar en las **Fotografías 4.0 a 4.4**. En la fotografía 4.0 se observan los calabacines en el día 0, antes del inicio de la experiencia, en las fotografías 4.1, 4.2, 4.3, y 4.4 se muestran, respectivamente, los frutos a los 12 días de conservación (fotos de la izquierda) y a los 14 días, tras dos días de reacondicionamiento (fotos de la derecha), para los 4 tratamientos realizados, control a 10°C, control a 1°C y tratamientos con 1-MCP y etileno.



Día 0

Fotografía 4.0

A los 12 días de conservación

Control 10°C



A los 14 días de conservación

Dos días a 20°C



Fotografía 4.1

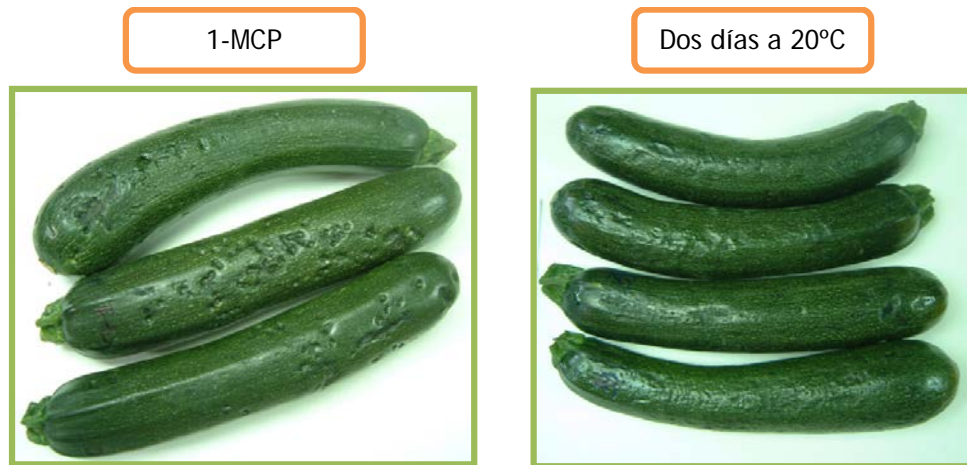
Control 1°C



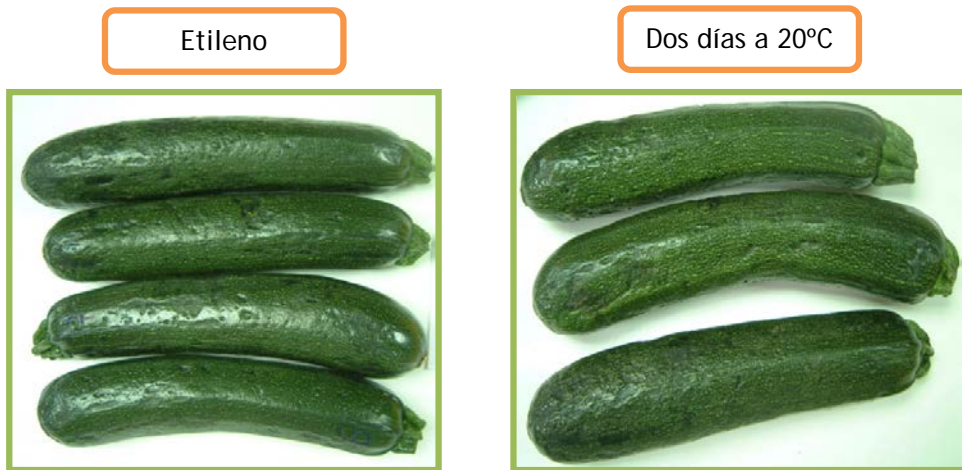
Dos días a 20°C



Fotografía 4.2



Fotografía 4.3



Fotografía 4.4

Fotografías 4.0 a 4.4 Calabacines en los distintos tratamientos.

Los DF en los frutos control a 1°C, y en los calabacines tratados con 1-MCP o etileno siguieron una evolución similar. Los primeros síntomas en los frutos a la salida de la cámara a 1°C se detectaron a partir de los 12 días siendo incluso superiores los síntomas de daños en los frutos tratados, con independencia del tratamiento recibido. Así, los frutos control a 1°C y los tratados con 1-MCP y etileno presentaron el $45 \pm 6\%$, $66 \pm 2\%$ y $90 \pm 4\%$ de la superficie del fruto afectada respectivamente. A los 19 días todos los frutos conservados en frío, tratados o no, alcanzaron niveles de daño del 90%. Los frutos control almacenados a 10°C durante 19 días, como era de esperar, no presentaron daños por frío.

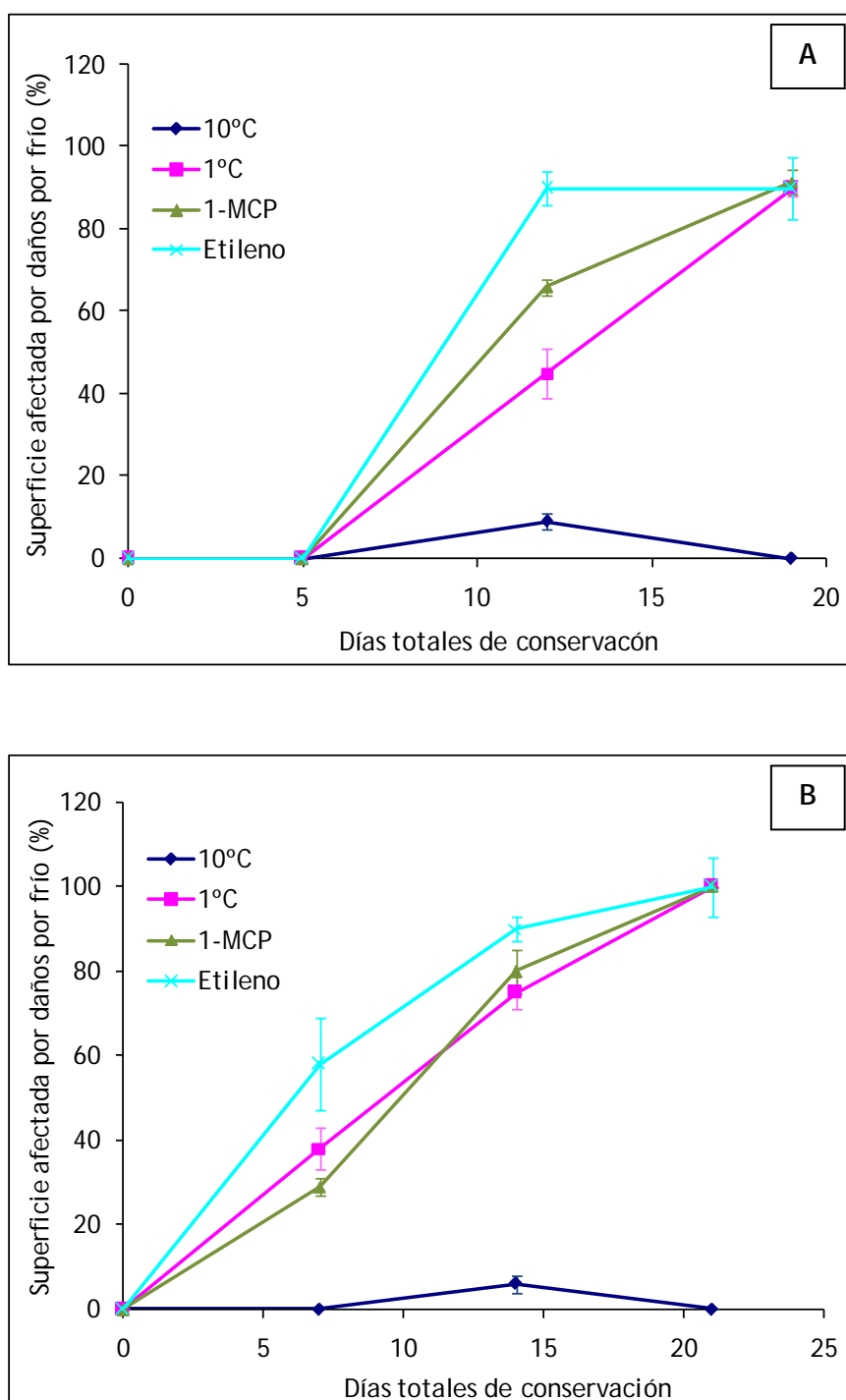


Figura 4.3. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno (A) $LSD_{0,05}=4,39$, y tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C (B) $LSD_{0,05}=5,79$ sobre los daños por frío. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones realizadas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

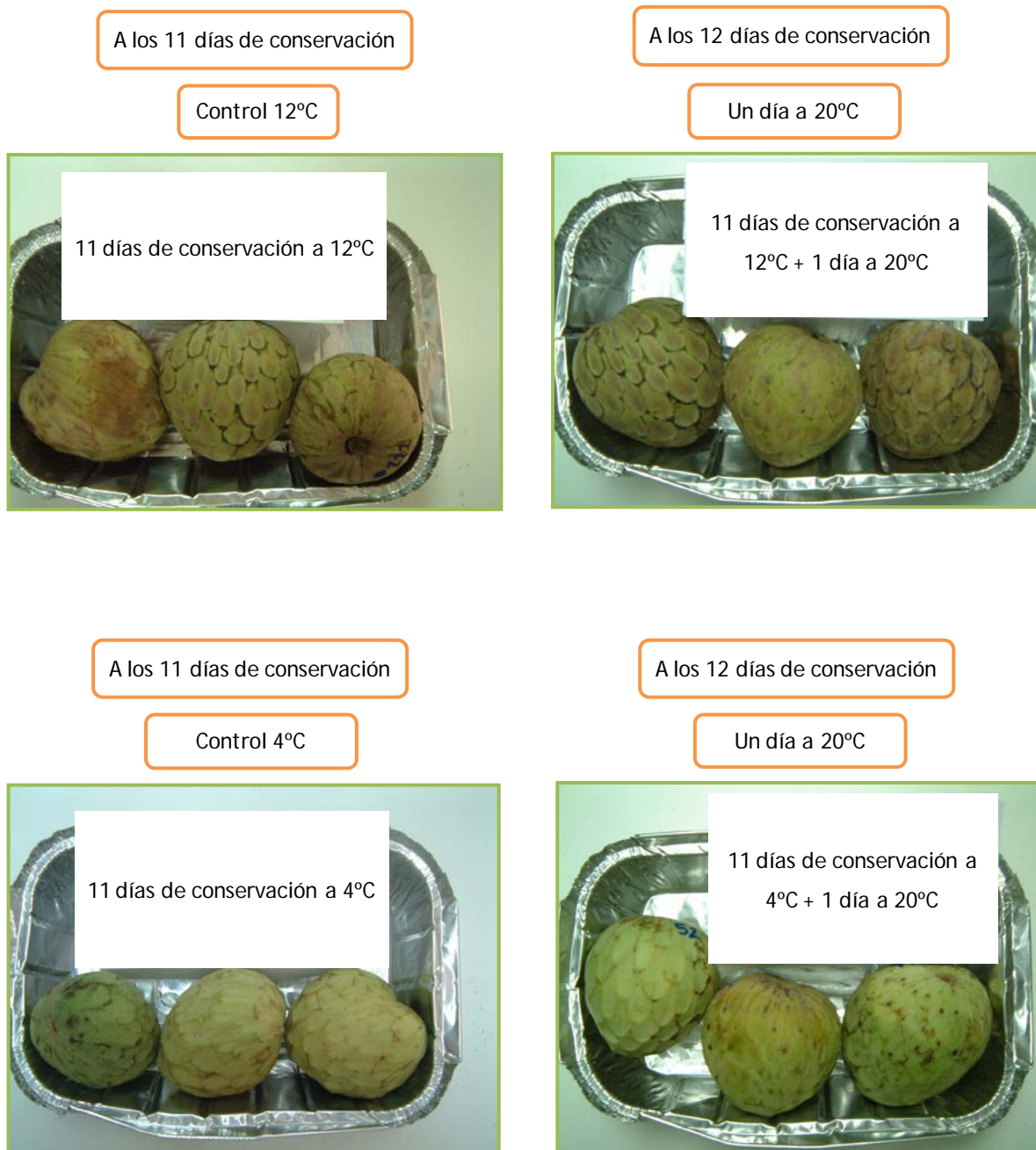
Los DF fueron más pronunciados y aparecieron antes cuando los frutos fueron sometidos a un periodo de reacondicionamiento; así pues, los primeros síntomas de DF tras el reacondicionamiento aparecieron en los frutos conservados a baja temperatura

durante 7 días mientras que los primeros síntomas de DF en los frutos no sometidos a reacondicionamiento, no aparecieron hasta los 12 días de conservación en frío. Además, en todos los casos los DF fueron superiores tras 48 horas de reacondicionamiento, confirmando que los síntomas de DF se incrementan significativamente al producirse la transferencia de los frutos a temperatura ambiente, coincidiendo con lo señalado por Wills *et al.*, 1998. El desarrollo de la fisiopatía de los daños por frío fue ligeramente mayor en los frutos tratados que en los controles conservados a la misma temperatura. Así pues, los tratamientos con 1-MCP y etileno, previos a la conservación de frutos de calabacín parecen no tener efecto o incluso agravar los síntomas de daños causados por el frío, más que proteger frente a este factor de estrés. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el etileno participa de alguna forma en la inducción de los daños por frío, como ya se ha visto con tratamientos de etileno exógeno en otros frutos como aguacate (Chaplin *et al.*, 1993; Pesis *et al.*, 2002) naranja (Porat *et al.*, 1999), ciruelas (Candan *et al.*, 2008) y cítricos (Yuen *et al.*, 1995).

Esta teoría, sin embargo, no puede generalizarse para todas las especies y variedades, habiéndose encontrado en plátano un efecto protector del etileno sobre los daños por frío (Wang *et al.*, 2006). En otros frutos como el melón "Piel de Sapo", no climatérico, el tratamiento con etileno exógeno provocó un incremento en el desarrollo de los DF, tras un periodo largo de conservación (24 días), pero no parece que induzca el inicio de la alteración de la corteza.

En chirimoya nos encontramos ante la misma situación y los síntomas que aparecen son similares a los que se presentan durante la senescencia y difieren en función de lo baja que sea la temperatura de refrigeración. Los síntomas más evidentes en chirimoya pueden ser una maduración anormal, pardeamiento de la piel, pequeñas depresiones marrones en la piel, decoloración de la pulpa, endurecimiento del fruto y vesículas de una coloración rosa pálido alrededor de las semillas (Gutiérrez *et al.*, 1994; Palma *et al.*, 1993).

En la **Fotografía 4.5**, se muestran las chirimoyas tras el periodo de 11 días a 12°C y a 4°C y después del reacondicionamiento a 20°C durante 1 día. En nuestra experiencia no se encontraron manifestaciones de daños por frío en la piel, ya que incluso los frutos conservados a 12°C presentaron un pardeamiento más acusado que los conservados a 4°C, debido a los síntomas característicos de la maduración y senescencia de este fruto. (Martínez *et al.*, 1993). Este hecho podría explicar también la diferencia que se apreció en los frutos tratados con etileno y 1-MCP, donde el pardeamiento fue más intenso en el primer caso y podría deberse a una activación de la senescencia de la corteza, mientras que el segundo, al bloquear los receptores del etileno retrasaría dicho proceso.



Fotografía 4.5.-Chirimoyas a los 11 días de conservación a 12°C y 4°C y tras el reacondicionamiento un día a 20°C.

Es interesante resaltar que los cambios de color de la corteza se limitan a un ligero pardeamiento debido a la polifenol oxidasa, que se hace más intenso al inicio de la senescencia. Por estas circunstancias, y porque en los frutos dañados el pardeamiento es

irregular, este síntoma no se consideró un buen marcador para evaluar los daños por frío. Tampoco se observaron síntomas de daños por frío en la pulpa, como decoloración o vesículas color rosa pálido, debido tal vez al haber realizado la experiencia en diciembre, a mitad de la temporada de recolección, cuando los frutos presentaban una menor sensibilidad (Gutiérrez *et al.*, 1994)

4.1.3.- Evolución de los parámetros fisiológicos en chirimoya

La maduración de la chirimoya se caracteriza por una rápida degradación del almidón en azúcares solubles, fundamentalmente glucosa y fructosa y contrariamente a la mayoría de los frutos un aumento del contenido en ácidos orgánicos y por lo tanto una caída del pH (Martínez *et al.*, 1993; Gutierrez *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2004).

En la **Figura 4.4** se muestra la evolución del contenido en sólidos solubles totales de los diferentes tratamientos tras el reacondicionamiento a 20°C. Cuando los frutos se conservaron a 12°C presentaron una maduración normal, con un aumento del contenido de los sólidos solubles rápido, alcanzando los $21,07 \pm 0,85^{\circ}\text{Brix}$ a los 5 días y llegando a un máximo de $23,07 \pm 0,57^{\circ}\text{Brix}$ a los 12 días. Los frutos conservados a 4°C no experimentaron un incremento tan acusado, ya que a los 12 días alcanzaron un valor que osciló entre $16,20 \pm 1,14$ y $17,07 \pm 1,60$, lo que supone del orden de 6°Brix menos. Los tratamientos con 1-MCP y etileno no afectaron significativamente al proceso de maduración ya que la evolución de los sólidos solubles fue similar a los frutos no tratados también a 4°C. A esta temperatura los frutos no presentaron una maduración normal a pesar de haber sido recolectados en su estado óptimo de madurez fisiológica, cuando se había iniciado la síntesis autocatalítica del etileno, ya que no se llegaron a alcanzar los valores de sólidos solubles adecuados para su consumo. La estabilidad de los $^{\circ}\text{Brix}$, sin diferencias significativas, entre los dos últimos muestreos (a los 8 y 12 días) confirma que a 4°C hubo un efecto del frío, que se manifestó por una maduración anómala de la chirimoya.

El tratamiento con etileno no estimuló ni frenó la capacidad de resistencia frente a la aparición de síntomas de DF en este fruto, aunque se ha encontrado que induce o intensifica la aparición y desarrollo de la alteración fisiológica en otras especies hortofrutícolas (Sevillano, 2007). Tampoco se observó un efecto protector frente a la maduración anormal, indicativa de los DF, con los tratamientos con el antagonista del etileno, el 1-MCP, aunque se vio que el tratamiento con este compuesto redujo los daños por frío en diversos frutos como caqui (Salvador *et al.*, 2004), piña (Selvarajah *et al.*, 2001) y melón Cantaloupe (Ben Amor *et al.*, 1999).

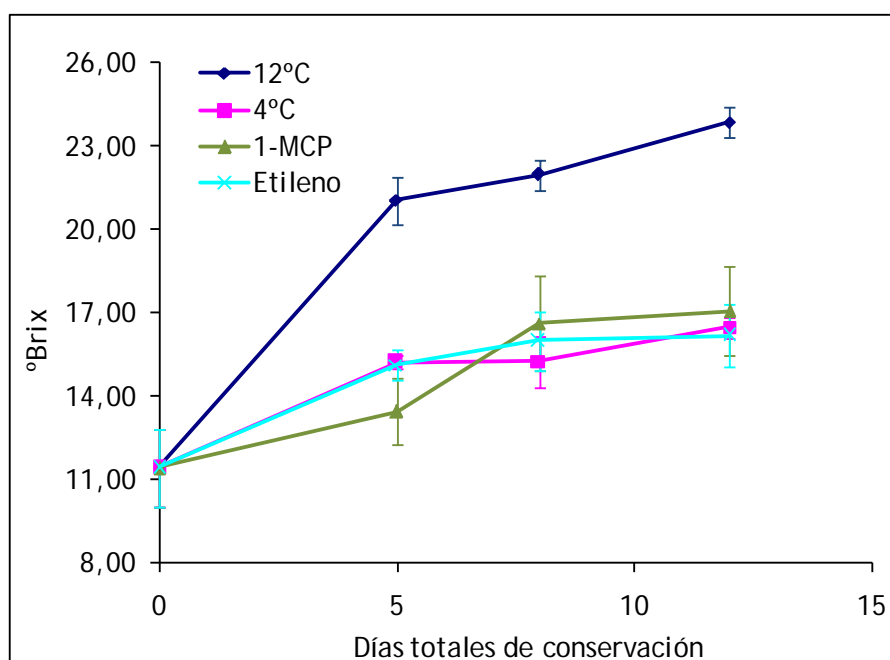


Figura 4.4. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre el contenido de sólidos solubles totales en mesocarpio. $LSD_{0,05}=1,63$. Los resultados se expresan en °Brix. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Por lo general, en los frutos la acidez disminuye durante la maduración, debido a la utilización de los ácidos orgánicos en la respiración (Solomos, 1983). En chirimoya sin embargo, la síntesis de ácidos orgánicos conduce a un aumento de la acidez en la pulpa y consecuentemente a una disminución de los valores del pH. La acidez de los frutos, expresada en gramos de ácido málico por 100 gramos de pulpa (Figura 4.5), aumentó cuando se conservó a 12°C, pasando de $0,11 \pm 0,004\%$ a $0,31 \pm 0,04\%$, lo que supone triplicar el valor de la acidez. Este aumento se debe principalmente al incremento de ácido málico, mayoritario en esta fruta, aunque otros ácidos pueden contribuir a su aumento, como el cítrico y ascórbico, que han sido determinados en otras especies de *Annonas* (Palma *et al.*, 1993).

Cuando los frutos se conservaron a 4°C y se transfieren a 20°C para su reacondicionamiento y maduración, la acidez osciló entre el $0,10 \pm 0,013\%$ y $0,16 \pm 0,004\%$, e incluso con una disminución del valor en el muestreo a los 8 días. Al igual que en la evolución de los sólidos solubles, la acidez no alcanzó los valores normales de la maduración. Los frutos sometidos a tratamientos con etileno y 1-MCP presentaron una evolución similar a los no tratados, manteniendo prácticamente los valores iniciales y no alcanzando los valores aceptables para el consumo (Sevillano, 2007). Los resultados parecen indicar que los tratamientos no influyen sobre los efectos del frío en la maduración.

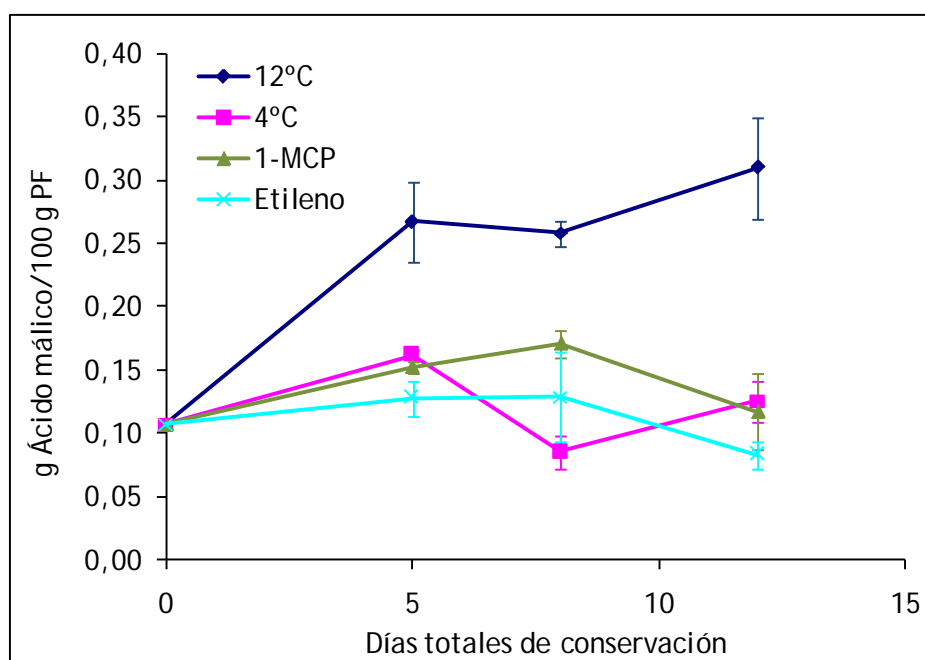


Figura 4.5. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la acidez valorable en mesocarpio. $LSD_{0,05}=0,03$. Los resultados se expresan en g de ácido málico/100g peso fresco. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Cuando las chirimoyas fueron recolectadas en el estado de madurez fisiológica, el pH del mesocarpio fue en torno a 6 y cuando se conservaron a 12°C, se observó una disminución paulatina hasta las $4,3 \pm 0,06$ unidades (Figura 4.6), siendo esta bajada consecuencia de un aumento de los ácidos orgánicos. Los frutos conservados a 4°C, prácticamente mantienen el valor inicial de pH. Como era de esperar los tratamientos con 1-MCP y etileno no influyeron en los valores del pH y no se observaron diferencias significativas entre los frutos tratados y los conservados a 4°C.

Estos resultados parecen indicar que las bajas temperaturas alteran el proceso normal de maduración en chirimoya, ya sea por transiciones de fase en las membranas celulares, por alteraciones en el citoesqueleto, modificaciones conformacionales de las proteínas o simplemente por cambios en la cinética de reacciones enzimáticas imprescindibles para la maduración (Sevillano, 2007). Por otro lado, los tratamientos con etileno y 1-MCP no influyeron en el efecto ocasionado por el frío sobre la maduración, ya que los frutos conservados a 4°C, tratados o no, no llegaron a alcanzar la maduración normal. Los frutos que presentaron daños por frío no llegaron a acidificarse convenientemente, ya que en los cambios de pH (Figura 4.6), es determinante la integridad subcelular (Sola *et al.*, 1994) que se altera con el proceso normal de maduración.

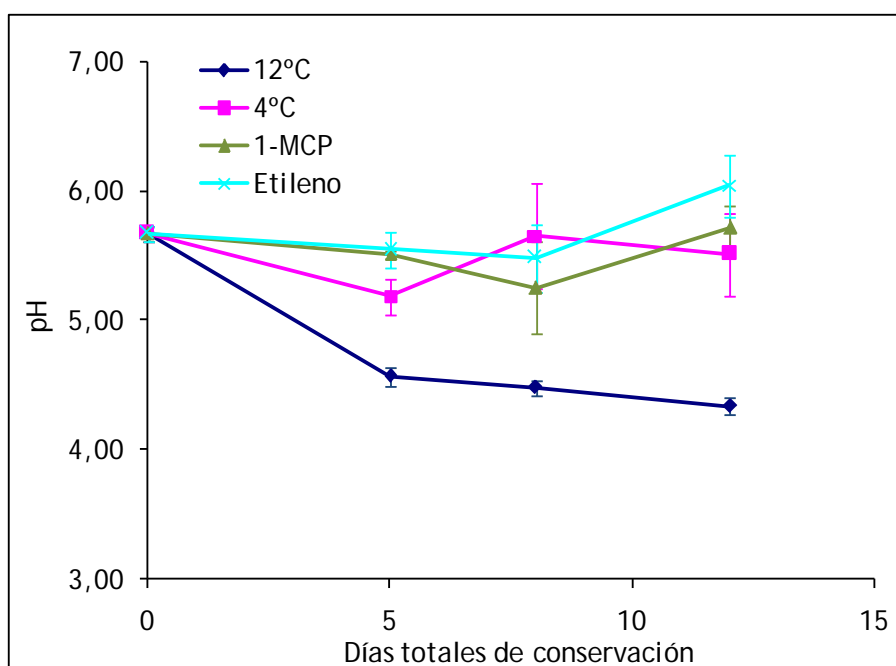


Figura 4.6. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la evolución del pH en mesocarpio. $LSD_{0,05}=0,29$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra

4.1.4.- Evolución de la producción de etileno

Por lo general, la exposición prolongada al frío de frutos genera diversas respuestas, como la expresión del incremento sostenido de la producción de etileno y la tasa respiratoria, como se ha detectado en melón, cítricos, pepino y patata, lo que puede ser indicativo de una perturbación metabólica irreversible y la acumulación de metabolitos intermedios oxidables (Wang, 1982).

En el caso del calabacín, al igual que en otros frutos no climatéricos, no parece que el etileno tenga un rol esencial en su metabolismo, aunque el etileno exógeno puede intervenir en ciertos procesos específicos (Pretel *et al.*, 1995). En la Figura 4.7 se recoge la evolución de la producción de etileno tras el reacondicionamiento a 20°C, de los frutos almacenados a 10°C y de los frutos control y tratados con 1-MCP y etileno, almacenados a 1°C. A la salida de la cámara de conservación, los niveles de etileno (datos no mostrados) fueron prácticamente nulos, no superando en ningún momento el valor de $0,15 \pm 0,01$ nL/g*h, siendo inferiores a los valores obtenidos en el muestreo correspondiente al día cero ($0,24 \pm 0,09$ nL/g*h). Los calabacines almacenados a 10°C experimentaron un incremento en la producción de etileno que alcanzó un máximo a los 7 días $0,97 \pm 0,09$ nL/g*h. Los frutos control almacenados a 1°C presentaron un aumento de la producción de etileno con un máximo en el día 14, no presentando diferencias significativas con respecto a los frutos conservados a 10°C. En ambos casos, la producción de etileno disminuyó en el

siguiente muestreo, alcanzando el mismo valor que el día cero. Esta disminución de la producción de etileno podría deberse a una pérdida de la integridad de las membranas afectando la conversión de ACC en etileno. (Field, 1990).

La producción de etileno de los calabacines tratados con 1-MCP, presentó una evolución similar a los conservados a 10°C y con niveles inferiores a los encontrados en los controles a 1°C tras 7 días de conservación. Aunque las diferencias con estos últimos son pequeñas, podría deberse a un bloqueo de la síntesis de etileno por bloqueo de los receptores por el 1-MCP, que es efectivo en los primeros muestreos y que en el último su acción ya no es tan efectiva, bien sea por la síntesis de nuevos receptores o por la disociación del receptor con el 1-MCP. Los frutos tratados con etileno también experimentaron un aumento de la producción de etileno a los 7 días de conservación para a continuación ir disminuyendo, siguiendo la misma evolución de los controles a 10°C y los tratados con 1-MCP, no pudiéndose apreciar diferencias significativas entre ellos.

Existen algunas evidencias que relacionan el metabolismo del etileno con los daños por frío en frutos no climatéricos. Por ejemplo, la utilización de atmósfera modificada, con una atmósfera de equilibrio del 15% de O₂ y 5% CO₂, reduce los daños por frío en el pimiento verde y reduce la emisión de etileno cuando son transferidos a 20°C, poniendo de manifiesto que en este fruto y solo en el estado verde puede haber una relación entre el etileno y los daños por frío (Serrano *et al.*, 1997). Estos mismos autores, encontraron que los pimientos verdes almacenados a 2°C experimentan un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la emisión de etileno a las tres y seis horas de haber sido transferidos a 20°C, lo que sugiere en este estado de madurez una conexión entre los daños por frío y una estimulación de la producción de etileno cuando son transferidos de 2°C a 20°C (Serrano *et al.*, 1997).

Sin embargo, en el caso del calabacín no se puede afirmar que exista una relación entre la producción de etileno y el desarrollo de los daños por frío, ya que el aumento que se observa en los controles a 10°C y 1°C y en los tratamientos de etileno y 1-MCP, tras dos días a 20°C es general, siendo incluso más elevada en el control a 10°C, donde no se detectan daños por frío. Se aprecia que en los frutos almacenados a 1°C sin tratamiento, la producción de etileno continua aumentando hasta los 14 días (12 días a 1°C + 2 días a 20°C), lo que podría indicar una posible relación. Sin embargo, este incremento de la producción de la hormona de la maduración no tiene lugar cuando se tratan con etileno, lo que no confirma la relación, pero es precisamente con este tratamiento cuando se aprecian mayores DF. Los tratamientos con 1-MCP y etileno no influyeron sobre la síntesis de etileno en calabacín.

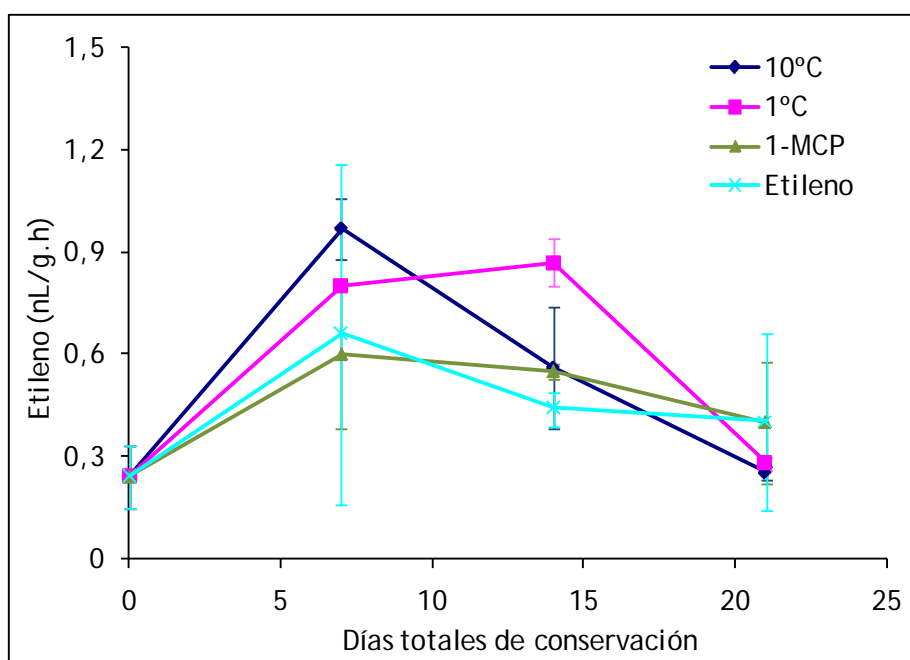


Figura 4.7. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la producción de etileno. $LSD_{0,05}=0,3$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones realizadas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Como ya se ha comentado, la chirimoya es un fruto climatérico y una de sus características más importantes es su capacidad para producir etileno a través de su síntesis autocatalítica, lo que posibilita que este fruto pueda madurar una vez separado de la planta cuando haya alcanzado dicha característica.

En la Figura 4.8 se recoge la evolución de la producción de etileno de las chirimoyas tras 24 horas de reacondicionamiento a 20°C. Pasadas las 24 horas de reacondicionamiento, las chirimoyas control conservadas a 12°C presentaron un aumento importante de la producción de etileno ($172,37 \pm 7,37$ nL/g*h) a los 8 días, el cual disminuyó hasta los $97,54 \pm 10,63$ nL/g*h a los 12 días del inicio de la conservación. Esta evolución es característica en la chirimoya, en la que la crisis etilénica se produce de una forma muy intensa y en un intervalo muy corto de tiempo (Palma *et al.*, 1993; Laoz *et al.*, 1993; Brow *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1993).

En las chirimoyas control almacenadas a 4°C se registró un pico de etileno a los 5 días (4 días a 4°C + 1 día a 20°C) que alcanzó los $162,08 \pm 30,36$ nL/g*h, disminuyendo drásticamente a los 8 días y manteniéndose estable hasta los 12 días de conservación. Los frutos tratados con etileno y mantenidos a 4°C presentaron una evolución similar, con un incremento muy acusado también a los 5 días, que pasó de $6,24 \pm 2,03$ nL/g*h al inicio de la experiencia (día cero), a $120,45 \pm 12,21$ nL/g*h, para a continuación disminuir a valores de $9,38 \pm 1,03$ nL/g*h en el último día de conservación. Estos resultados parecen indicar

que hay una respuesta de estrés al pasar los frutos de una baja temperatura (4°C) a otra más elevada (20°C), lo que implica la puesta en marcha más rápida de la síntesis autocatalítica de etileno, que en los frutos control almacenados a 12°C.

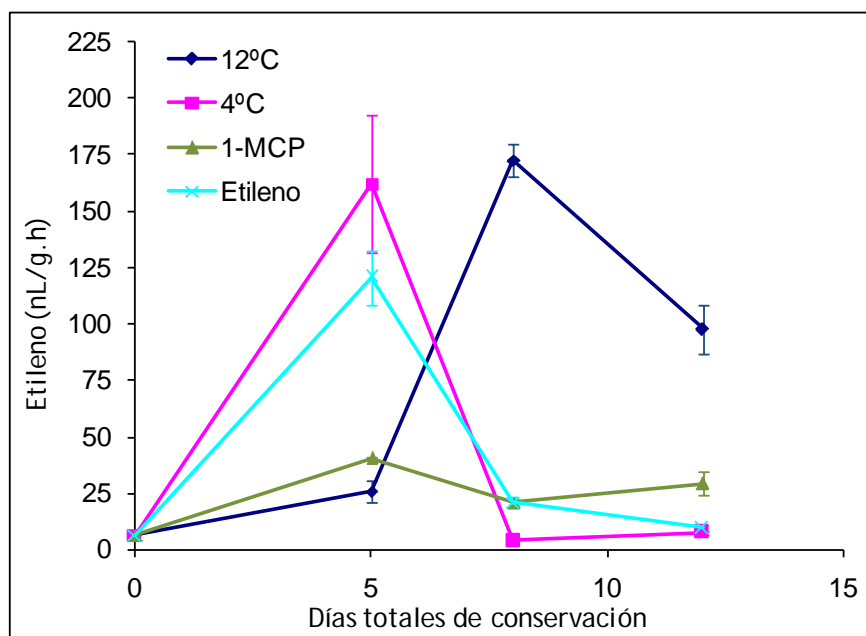


Figura 4.8. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la producción de etileno. $LSD_{0,05}=13,17$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Los tratamientos con 1-MCP han sido muy efectivos para prevenir daños por frío en diversos frutos climatéricos. La reducción de los daños por frío por este tratamiento se ha observado en caqui (Salvador *et al.*, 2004), melón Cantaloupe (Ben Amor *et al.*, 1999) cuando se realiza previamente a la conservación en frío. En albaricoque se ha encontrado que el tratamiento con 1-MCP antes de la conservación en frío no previene el pardeamiento interno de la pulpa, síntoma característico de estos frutos de daños por frío. Dong *et al.*, (2002) observaron que el tratamiento fue efectivo tras la conservación en frío. Sin embargo, en aguacate se observa una respuesta parcial, ya que los frutos tratados con 1-MCP muestran una reducción de los daños por frío en la pulpa (Pesis *et al.*, 2002), mientras que no tiene efectos sobre el pardeamiento de la corteza (Woolf *et al.*, 2005). En otros frutos se ha puesto de manifiesto una reducción de los daños por frío cuando eran tratados con esta olefina antagonista de la biosíntesis del etileno, si bien la eficacia de su acción es limitada ya que el fruto puede sintetizar nuevos receptores o recobrar su sensibilidad a la hormona debido a un desprendimiento del 1-MCP.

En cuanto a las chirimoyas tratadas con 1-MCP se observa el efecto de la inhibición de la síntesis del etileno, por bloqueo de los receptores del mismo. Aunque la inhibición es muy acusada con respecto a los frutos conservados a 12°C y 4°C, del orden del 77%, no

llega a ser tan acusada como cuando se utilizan otras técnicas, como la biotecnología, que en el caso del melón Cantaloupe llega hasta el 99,95% (Ayub *et al.*, 1996). Si consideramos que a 4°C se altera el proceso normal de maduración y que no se han encontrado diferencias significativas en la evolución de la acidez, sólidos solubles y pH entre los controles y los tratados con etileno y 1-MCP, no parece que el etileno tenga una acción directa sobre el desarrollo de los daños por frío en chirimoya.

4.1.5.-Evolución del color

El color es uno de los atributos sensoriales que valora el consumidor para la adquisición de un producto, contribuyendo más a la valoración de la calidad que ningún factor individualmente. Esta valoración es aplicable tanto a la corteza como a la pulpa del fruto.

El color se determinó en la piel mediante los parámetros L, a y b por reflexión utilizando el espacio de color CIE-L*a*b* una vez finalizada la conservación a 20°C. La luminosidad (Figura 4.9) prácticamente no presentó modificaciones durante el periodo de conservación, manteniéndose los valores a niveles del control del día cero ($34,42 \pm 2,84$). No se apreciaron diferencias significativas entre los frutos a diferentes temperaturas de conservación y sometidos a diferentes tratamientos, evolucionando los valores entre límites muy estrechos. Resultados similares se encontraron en pimiento (Pretel *et al.*, 1995) y en fresa (Given *et al.*, 1988).

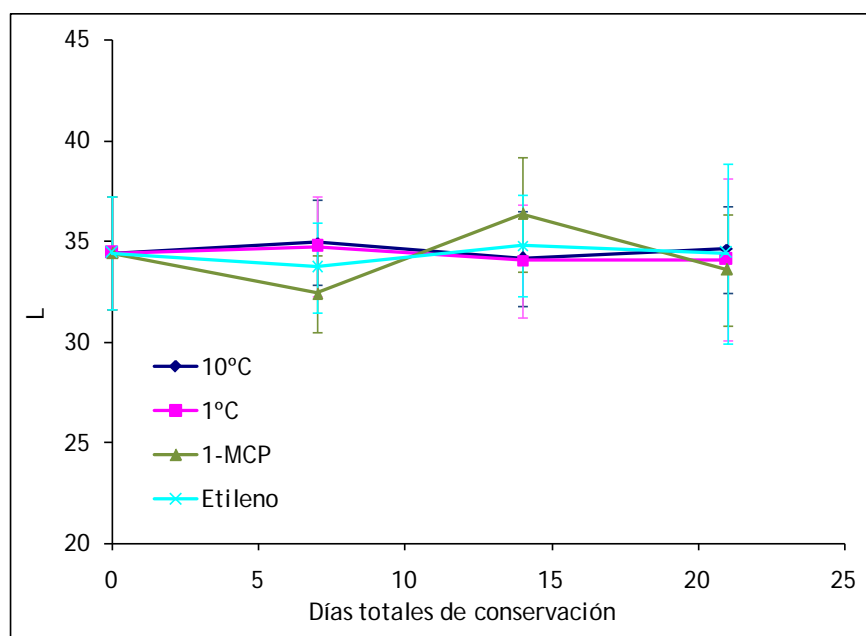


Figura 4.9. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la evolución del parámetro de color "L" en la piel. $LSD_{0,05}=4,9$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones realizadas en cada uno de los seis frutos de las muestra.

En la **Figura 4.10** se recogen los resultados del parámetro "a". Al igual que la luminosidad se mantiene durante la experiencia con valores muy similares a los encontrados para el día 0, en torno a $-8 \pm 2,15$, no presentando diferencias significativas entre tratamientos y temperaturas de conservación.

El parámetro "b" de color (**Figura 4.11**) osciló entre valores muy estrechos, con un valor inicial de $10,94 \pm 2,33$, aumentando ligeramente durante la conservación, con perfiles similares entre tratamientos, observando que los calabacines sometidos al tratamiento con 1-MCP mostraron los valores extremos de la experiencia, con el valor más bajo de $9,66 \pm 1,64$ y el más alto con $13,38 \pm 3,49$, aunque tampoco se encontraron diferencias significativas.

Los síntomas de daños por frío en calabacín no se manifiestan en el color de los frutos, ya que no se observan ni pardeamientos, ni amarillamiento de la piel, síntomas característicos del desarrollo de esta fisiopatía. Los resultados obtenidos muestran que no hay variaciones del color durante el tiempo que dura la experiencia entre los controles a 10°C , los controles a 1°C y los tratamientos con 1-MCP y etileno.

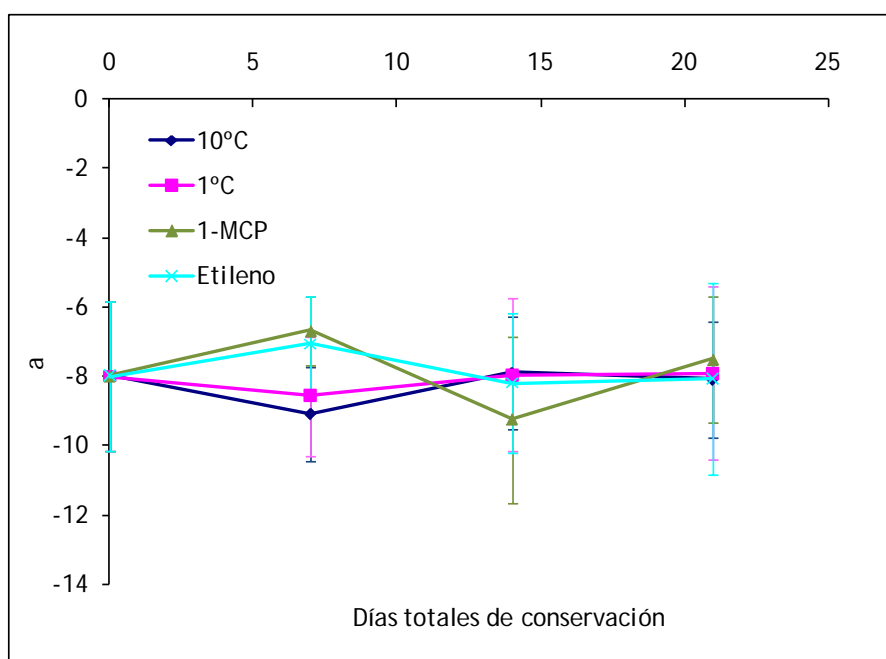


Figura 4.10. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la evolución del parámetro de color "a" en la piel. $LSD_{0,05}=2,9$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones realizadas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

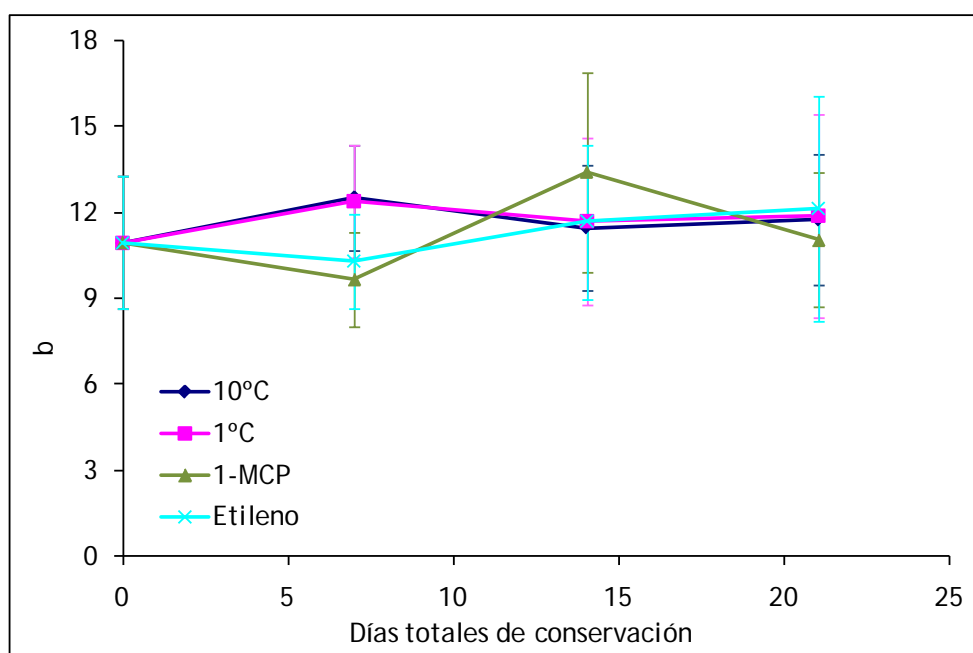


Figura 4.11. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la evolución del parámetro de color "b" en la piel. $LSD_{0,05}=3,73$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones realizadas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

En la **Figura 4.12** se recoge la evolución de la luminosidad en la piel de la chirimoya, observándose diferencias significativas entre los frutos conservados a 4°C y 12°C a partir del octavo día de almacenamiento. La disminución del valor L indica un oscurecimiento de la piel debido a procesos oxidativos que degradan las clorofilas a feofitinas y feórfidos. Esta evolución confirma las diferencias en la maduración entre las dos temperaturas, ya que una de las características de este proceso en la chirimoya es el pardeamiento de la piel. En el caso de los frutos conservados a 4°C, con y sin tratamientos, la caída de L es menor y más atenuada, pasando de 70 a 60 y no mostrando diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Esta evolución parece confirmar los resultados encontrados al estudiar los parámetros de maduración, que mostraban una evolución anómala, no alcanzando los atributos sensoriales característicos de este fruto.

En la **Figura 4.13** se recoge la evolución de la coordenada de cromaticidad "a". Este parámetro muestra también diferencias significativas entre los frutos conservados a 12° y 4°C, igual que para la luminosidad. La conservación a 4°C retrasa la maduración de los frutos cuando se transfieren a 20°C, alcanzando valores que oscilan entre -9 y -13, manteniendo el valor más bajo para el control. Los frutos controles a 4°C y los tratados no presentan diferencias significativas, aunque los valores de estos últimos son ligeramente superiores.

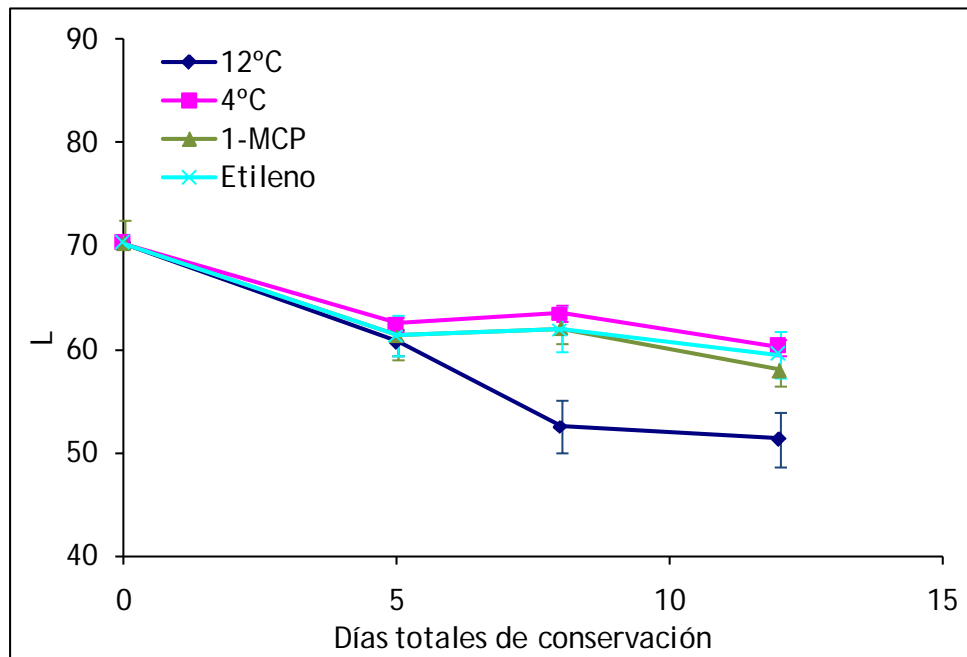


Figura 4.12. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la evolución del parámetro de color "L" en la piel. $LSD_{0,05}=2,30$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

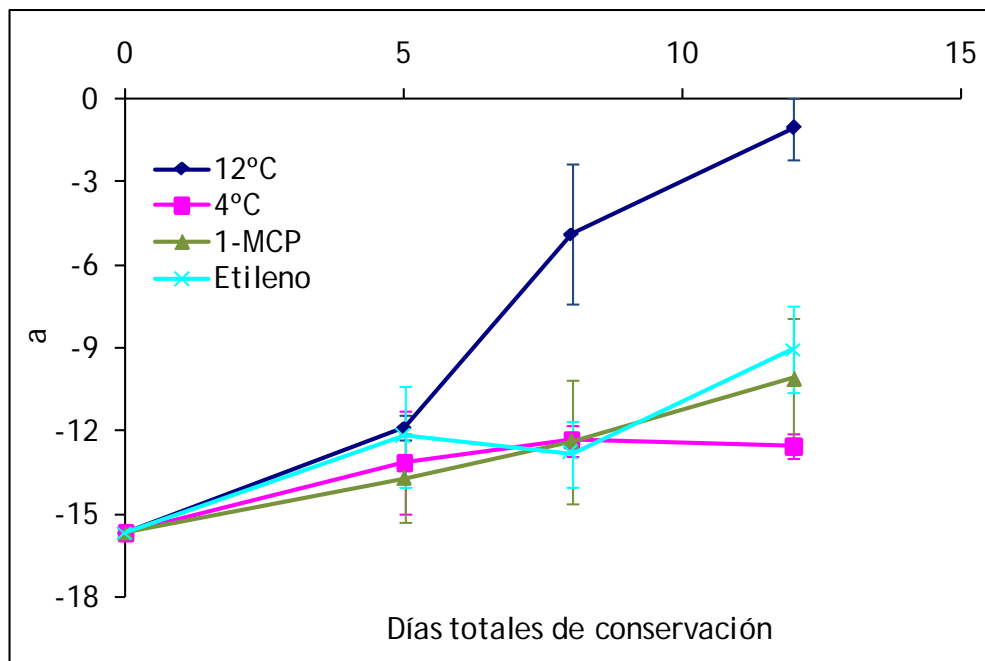


Figura 4.13. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la evolución del parámetro de color "a" en la piel. $LSD_{0,05}=2,02$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

El parámetro de color *b* (Figura 4.14) se mantuvo constante durante toda la experiencia realizada a 4°C, tanto en el control como en los tratados con 1-MCP y etileno. Los valores oscilan sobre 35 y no existen diferencias significativas entre ellos. A 12°C se observa una disminución a partir del quinto día de conservación, que se mantiene hasta el último día de la experiencia. Dado que la coordenada *b* expresa la gama de colores desde el color azul al amarillo, la evolución lógicamente está relacionada con el pardeamiento de la corteza y la pérdida de clorofilas.

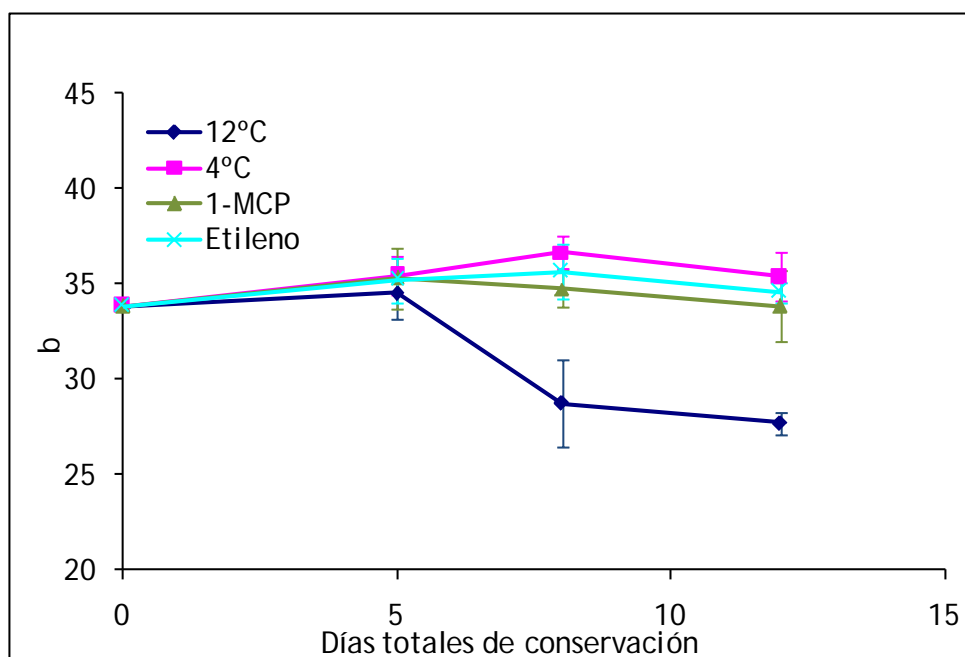


Figura 4.14. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la evolución del parámetro de color "b" en la piel. $LSD_{0,05}=1,69$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

4.2.- ANÁLISIS DEL ESTADO OXIDATIVO DE LAS MEMBRANAS

Uno de los efectos directos de la baja temperatura, es la alteración de las propiedades físicas de las membranas; la conservación en frío conduce a la reducción de la elasticidad de la membrana debido a una disminución de la fluidez en los lípidos que la componen. Estos cambios conducen a su vez a la alteración de los procesos que en ella se dan, incluyendo la actividad de las enzimas unidas a membrana como la ATPasa, la apertura/cierre de los canales iónicos, la transferencia de electrones asociada a las membranas y el aumento de la difusión lateral de los fosfolípidos, esteroides y proteínas de membrana (Kasamo *et al.*, 2000).

En frutos sensibles al daño por frío, las temperaturas de refrigeración superiores a la temperatura de congelación provocan cambios de fase de las membranas celulares pasando de líquido-cristalino a sólido-gel (Lyons, 1973). Se cree que transiciones de fase de incluso pequeñas fracciones de lípidos de membrana dan como resultado la formación de dominios sólidos en la membrana que causan daños celulares (Thompson, 1989). En este sentido, la composición de las membranas es fundamental para que se mantengan funcionales a baja temperatura (Lyons, 1973). En frutos sensibles a DF, la conservación en frío produce degradación de galactolípidos y fosfolípidos dando como resultado un aumento de ácidos grasos libres que son más susceptibles de ser oxidados por las especies reactivas de oxígeno generadas durante esa conservación. Los ácidos grasos polinsaturados se oxidan mejor que los saturados y los monoinsaturados, debido a que los metilenos entre un doble enlace pueden perder fácilmente un hidrógeno. La principal especie reactiva que puede robar estos hidrógenos es el radical OH^\cdot . De igual forma, pueden sufrir reacciones análogas de oxidación, otras estructuras del fruto como la vitamina A, los carotenos y la vitamina E (α -tocoferol) (Cheftel y Cheftel, 1992).

El proceso de oxidación lipídica se hace autocatalítico después de iniciarse, y a consecuencia de él, se establecen enlaces cruzados lípido-lípido, proteína-proteína y lípido-proteína. Además, los lípidos peroxidados son compuestos más polares y difícilmente estables en el interior hidrofóbico de la membrana. Todas estas transformaciones originan un aumento de la permeabilidad inespecífica a los iones e inactiva las enzimas ligadas a la membrana, obteniendo como resultado la pérdida de estructura de la bicapa lipídica y finalmente la lisis celular (Kunimoto *et al.*, 1981).

En este trabajo se ha estimado el estado oxidativo y la integridad de las membranas celulares mediante dos parámetros: el porcentaje de salida de electrolitos de las membranas y el contenido en peróxidos lipídicos.

4.2.1.-Evolución del porcentaje de salida de electrolitos

A lo largo de la maduración y senescencia y, en situación de estrés tiene lugar una serie de procesos metabólicos oxidativos que afectan a la estructura de las membranas celulares, alterando su permeabilidad y ocasionando disfunciones celulares, entre las cuales cabe citar el flujo no controlado de salida de electrolitos (Lyons, 1973; Sevillano *et al.*, 2009).

En la **Figura 4.15A** se recoge la evolución de la salida de electrolitos en la piel de los frutos de calabacín almacenados a 10°C y a 1°C y tratados con 1-MCP y etileno. Se observa que hasta los 14 días de conservación no hay diferencias significativas entre los distintos controles y tratamientos, manteniéndose los valores al mismo nivel que la

muestra correspondiente al día cero, lo que indica que la estructura de las membranas celulares no ha sufrido daños que afecten al flujo de iones.

Por el contrario, a los 21 días de almacenamiento a 1°C se apreció un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la salida de electrolitos en todos los frutos almacenados a baja temperatura, independientemente del tratamiento aplicado (control, 1-MCP, etileno), lo que parece indicar, al igual que ocurría en otros parámetros físico-químicos estudiados, que los tratamientos no tienen una acción positiva o negativa sobre la degradación de la estructura de las membranas provocada por la conservación en frío.

Las membranas celulares de los calabacines conservados a 10°C mantuvieron su estructura intacta durante todo el tiempo de conservación, presentando valores de salida de electrolitos prácticamente constantes.

En pulpa (Figura 4.15B) se observó una evolución similar pero menos acusada, indicativa de que en esta parte del fruto los daños por frío o no se ponen de manifiesto o son mucho menores, de hecho, en la apreciación visual no se apreciaron daños por frío en ninguna de las muestras.

En los frutos control a 10°C los valores oscilaron entre un margen muy estrecho, no existiendo diferencias significativas entre las diferentes muestras. En el caso de la conservación a 1°C con o sin tratamientos, la salida de electrolitos también aumentó ligeramente a partir de los 14 días, si bien es menos acusado que en la piel.

Al contrastar los valores en los dos tejidos estudiados, se deduce que la mayor susceptibilidad de la piel a los daños por frío se puso de manifiesto en la permeabilidad o pérdida de electrolitos. Esta alteración del flujo de iones ha sido descrita también en otros frutos sometidos a estrés por frío, como cítricos y melón (Lipton y Aharoni, 1979; Sala y Lafuente, 2000)

En un estudio llevado a cabo en diferentes variedades de calabacín conservados a 4°C durante 7 y 14 días (Carvajal *et al.*, 2011), se observó que la variedad presentaba gran influencia sobre el porcentaje de salida de electrolitos. Así pues, en la variedad "Natura" la salida de electrolitos disminuyó con el tiempo de conservación, mientras que en el resto de las variedades se observó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) a lo largo del periodo de conservación, similar al encontrado en la variedad estudiada por nosotros.

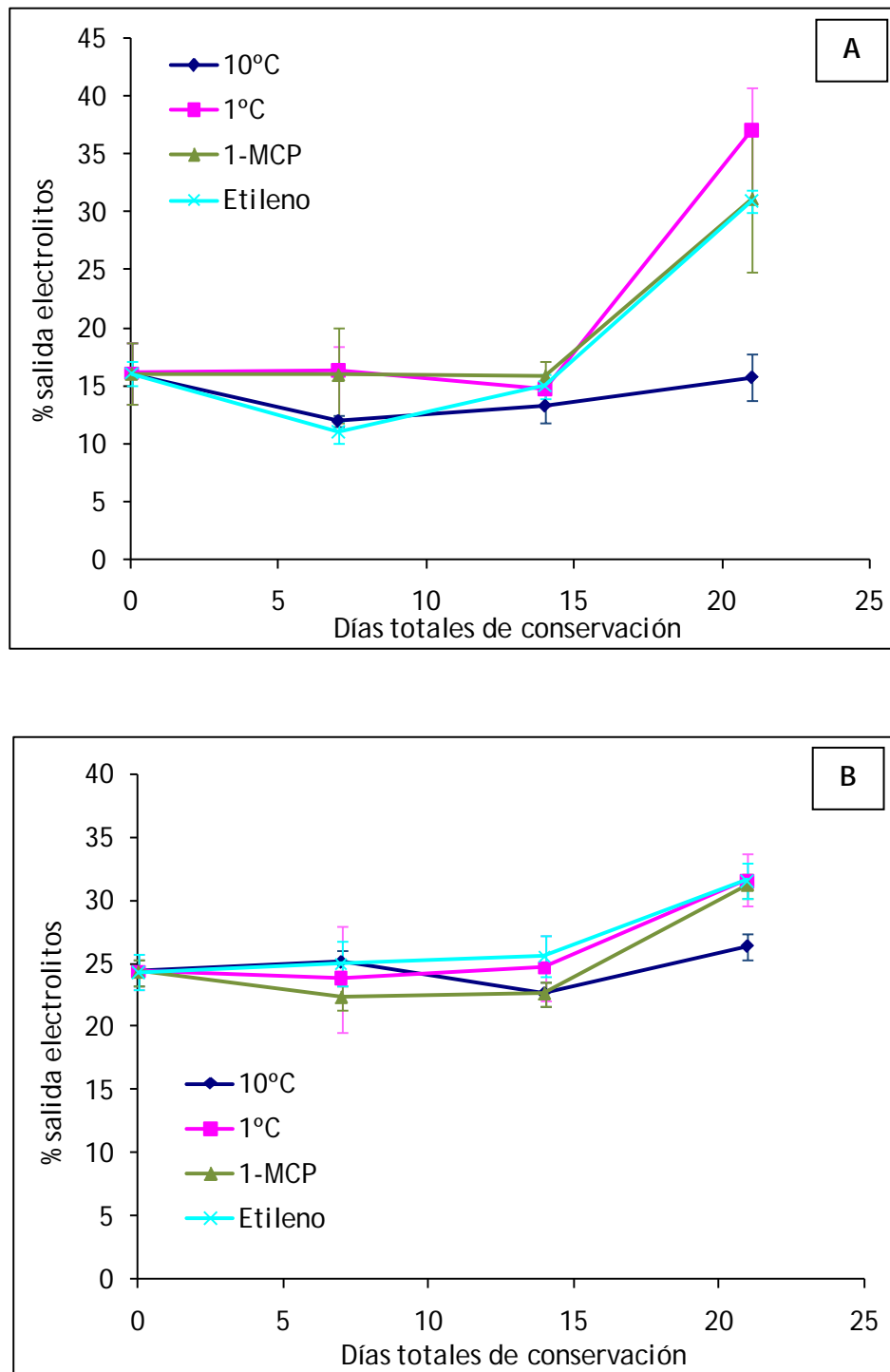


Figura 4.15. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre el porcentaje de salida de electrolitos en piel (A) $LSD_{0,05}=5,02$ y en pulpa (B) $LSD_{0,05}=3,35$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

En la **Figura 4.16** se recoge la evolución de la salida de electrolitos en la corteza de chirimoya tras el reacondicionamiento durante 24 horas a 20°C. La pérdida de electrolitos en la piel de la chirimoya se mantuvo entre el 70 y 80% durante toda la experiencia en los frutos mantenidos a 12°C, como cabe esperar que ocurra en un proceso de maduración. Se observó una diferenciación neta entre los valores encontrados en los frutos almacenados a 12°C y el resto de frutos almacenados a 4°C. Así, la salida de electrolitos en los frutos refrigerados se mantuvo en niveles bastante inferiores a la observada en las muestras conservadas a 12°C, oscilando entre el 20 y 40 %. Respecto al conjunto de frutos mantenidos a 4°C, cabe destacar los valores obtenidos a los 5 días de almacenamiento, donde los frutos control presentaron mayor salida de electrolitos que los sometidos a tratamientos con 1-MCP y etileno. Tras 8 días de conservación, la tendencia se invierte y son los frutos tratados los que presentan una mayor salida de electrolitos.

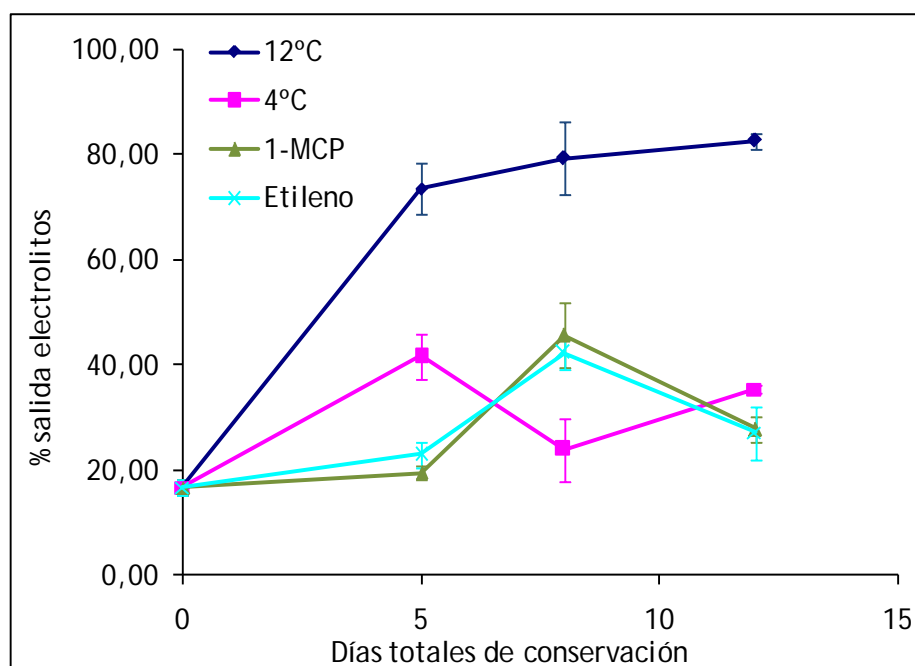


Figura 4.16. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre el porcentaje de salida de electrolitos en piel. $LSD_{0,05}=5,47$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Como se ha indicado, durante la maduración, así como en situaciones de estrés, se ponen en marcha una serie de procesos metabólicos oxidativos que afectan a la estructura de las membranas celulares, alterando su permeabilidad y ocasionando el flujo no controlado de salida de electrolitos (Sevillano *et al.*, 2009). La chirimoya es un fruto altamente susceptible a desarrollar daños por frío, siendo la temperatura mínima de almacenamiento de 10°C, y por debajo de esta temperatura la maduración de la fruta se

ve comprometida, no llegando a desarrollar las características organolépticas normales de la fruta madura (Sevillano *et al.*, 2009).

En este contexto, la mayor salida de electrolitos que tiene lugar en los frutos control a 12°C respecto al resto de los frutos sometidos a bajas temperaturas, indica que estos frutos son los únicos en los que se ha dado un proceso de maduración normal.

Los frutos conservados a bajas temperaturas presentan una alteración importante en la maduración, no presentando un aumento importante de la desestructuración de las membranas típico del proceso de maduración.

4.2.2. Evolución de la peroxidación lipídica

El estrés oxidativo se considera una de las primeras respuestas de los tejidos sensibles a los daños por frío, que tiene lugar durante su conservación a bajas temperaturas. Está asociado a una estimulación de la actividad lipoxigenasa, involucrada en reacciones de peroxidación de lípidos y la generación de especies reactivas de oxígeno (Hariyadi y Parkin, 1991). Al ser el malondialdehído un producto de la peroxidación lipídica, su concentración es indicativa de la magnitud de la peroxidación o indirectamente, del estado de las membranas celulares.

La peroxidación lipídica produce la desestabilización de la membrana al incrementarse la producción de radicales libres tóxicos. Esta peroxidación puede iniciarse por una actividad redox de los iones metálicos, tales como el cobre o el hierro, siendo la enzima lipoxigenasa la responsable de oxidar los ácidos grasos insaturados, produciendo radicales libres. Estos procesos tienen una repercusión esencial en el proceso de maduración ya que tienden a acelerarlo y a adelantar la senescencia, acortando sensiblemente la vida comercial útil de los frutos.

Como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, la peroxidación lipídica tanto en calabacín como en chirimoya, se midió por la cantidad de ácido malondialdehído (MDA) formado en la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). La **Figura 4.17** muestra la evolución de la concentración de malondialdehído en piel (**Figura 4.17A**) y pulpa de calabacín (**Figura 4.17B**). La peroxidación lipídica aumentó en todas las muestras sometidas a bajas temperaturas tanto en piel como en pulpa, aunque en general fue mayor en la pulpa que en la piel de calabacín. Los frutos almacenados a temperatura de no daño (control 10°C), mostraron un aumento de la peroxidación lipídica en pulpa durante su maduración menos acusado que las muestras sometidas a estrés por frío (control 1°C, 1-MCP y etileno), y este aumento fue más acusado en las muestras previamente tratadas con C₂H₄. El tratamiento con etileno provocó un considerable estrés oxidativo en los frutos que se tradujo en un aumento significativo ($p \leq 0,05$) del contenido

en MDA y por tanto de la peroxidación lipídica durante todo el tiempo de conservación, alcanzando el nivel máximo de $23,05 \pm 1,67$ nmol MDA/g.PF a los 21 días de conservación.

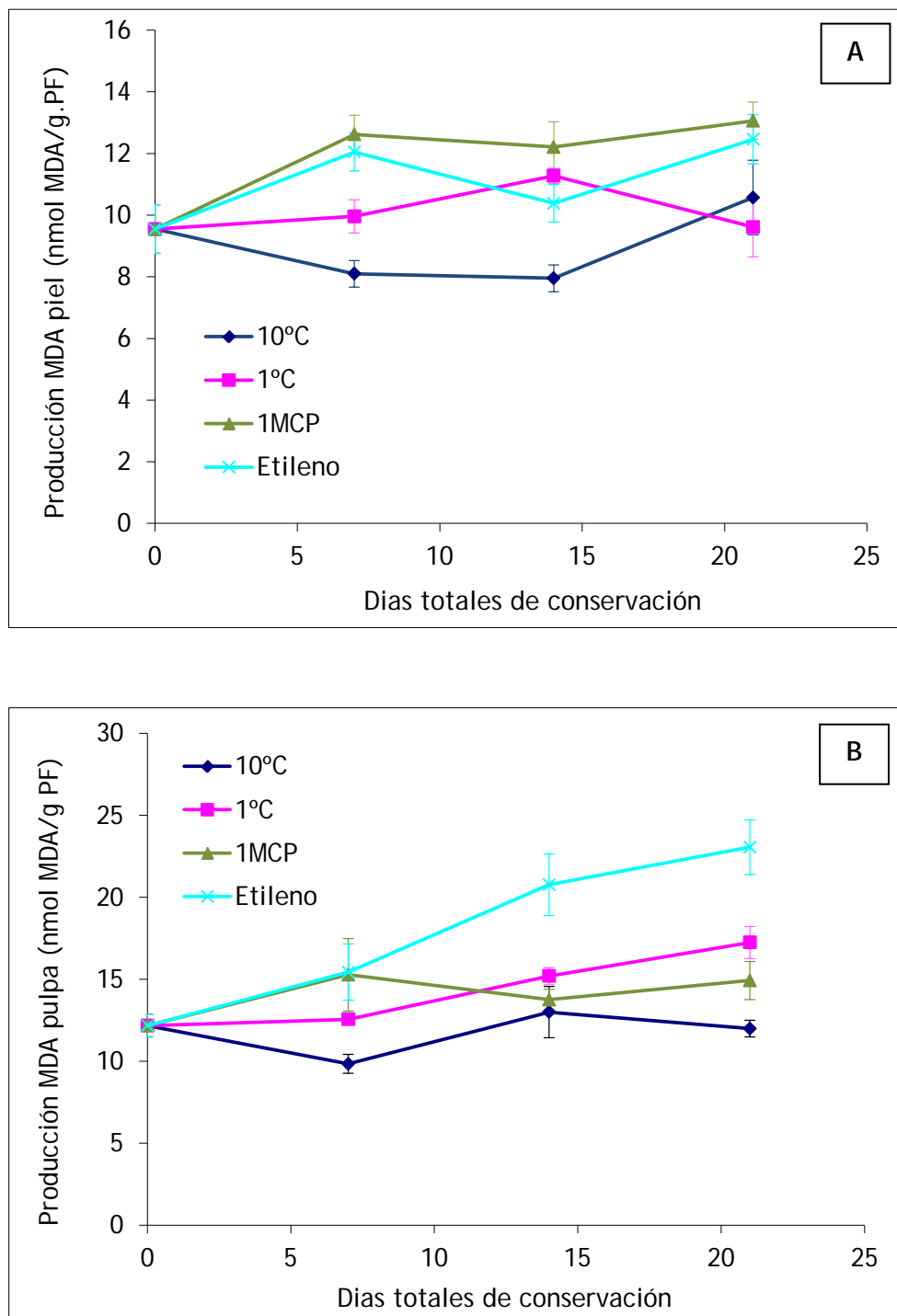


Figura 4.17. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la producción de MDA en piel (A) $LSD_{0,05}=1,06$ y en pulpa (B) $LSD_{0,05}=1,71$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

El tratamiento con 1-MCP no tuvo ningún efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre los niveles de MDA en pulpa respecto a las muestras control que habían sido sometidas a baja temperatura. La concentración de MDA en piel de calabacín hasta los 14 días, en general fue mayor en todos los frutos almacenados a temperatura de DF que en los almacenados a 10°C. Al contrario de lo que ocurría en pulpa, los frutos tratados con etileno no mostraron mayor peroxidación lipídica que los frutos control sometidos a bajas temperatura.

El aumento de la peroxidación lipídica ha sido asociado en numerosas ocasiones tanto a la maduración y senescencia como a los procesos del desarrollo de los daños por frío, siendo en este último caso uno de los marcadores más claros para el estudio del desarrollo de la fisiopatía (Sevillano *et al.*, 2009; Martínez-Tellez *et al.*, 2002; Carvajal *et al.*, 2011). Recientemente se ha observado en frutos de pimiento sometidos a bajas temperaturas un aumento del contenido en MDA en los frutos con DF, asociado a la degradación de plastos y peroxisomas (Sánchez-Bel *et al.*, 2012). Los peroxisomas y plastos están rodeados por membranas lipídicas simples y por tanto son orgánulos muy frágiles frente a la oxidación lipídica, de modo que su degradación y desaparición durante el desarrollo de los DF, es debida a la degradación oxidativa de sus membranas lipídicas por la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Otros estudios han observado que las bajas temperaturas originan, en frutos susceptibles, una pérdida de la homeostasis redox debido a un incremento desmesurado en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sevillano *et al.*, 2009). En nuestro estudio, el aumento de la peroxidación lipídica podría ir asociado al desarrollo de daños por frío.

La concentración de malondialdehído en frutos de chirimoya aumentó de forma acusada durante el proceso de conservación en los controles a 12°C como se muestra en la figura (Figura 4.18). Al igual que ocurría en el caso de la salida de electrolitos, se observa que la concentración de MDA es mayor en los frutos almacenados a 12°C que en los almacenados a 4°C, aunque los patrones de comportamiento en ambos casos son similares presentando un aumento más brusco a los 5 días de conservación indicando un estrés oxidativo. Respecto a los frutos tratados con 1-MCP y etileno, se observó un retraso en el aumento de la peroxidación lipídica no presentando el pico de MDA hasta los 8 días de conservación. Tras 12 días de conservación, las muestras tratadas con 1-MCP presentaron una disminución del contenido en MDA indicando una estabilización de las membranas celulares tras el estrés inicial. Esto no fue así en el caso de los tratamientos con etileno donde el contenido de MDA de las muestras siguió aumentando hasta el final de la conservación.

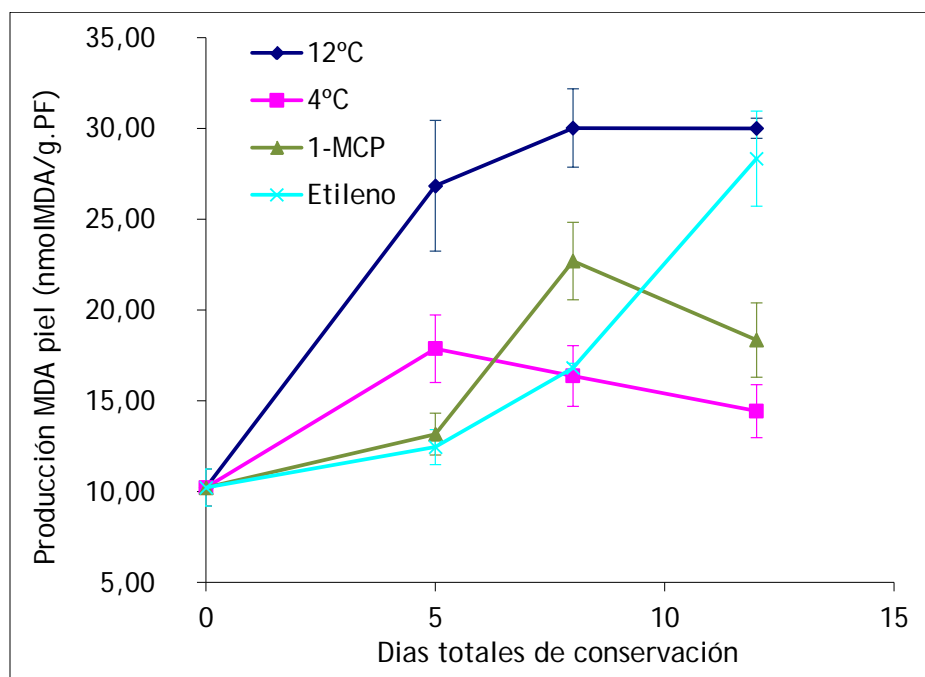


Figura 4.18. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la producción de MDA en piel $LSD_{0,05}=2,53$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

4.3.- EVOLUCION DEL ESTADO OXIDATIVO

4.3.1. Evolución del contenido en fenoles totales.

La acción de los compuestos fenólicos como antioxidantes, proporciona numerosos efectos beneficiosos, tanto para los alimentos como para el cuerpo humano, ya que estos se oxidan preferentemente frente a los constituyentes del alimento o los compuestos celulares y tejidos (Robards *et al.*, 1999). Los antioxidantes fenólicos son capaces de finalizar las reacciones en cadena de radicales libres, a través de la rápida donación de un átomo de hidrógeno a un radical, además estos pueden actuar como quelantes de iones de metales de transición, los cuales son potentes catalizadores de las reacciones oxidativas (Robards *et al.*, 1999). La composición y concentración de los compuestos fenólicos en el fruto varía durante el desarrollo, maduración y/o almacenamiento poscosecha. En la mayoría de los casos la concentración de los compuestos fenólicos aumenta durante el desarrollo del fruto, para posteriormente disminuir o permanecer constante durante la maduración del mismo. Sin embargo, el patrón de cambio de los compuestos fenólicos durante el desarrollo y maduración del fruto es muy variable y va a depender de la especie, y variedad. Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente, uno de los

síntomas inducidos por los DF en los frutos es la modificación del estado oxidativo de los tejidos.

El contenido en polifenoles en la piel de calabacines recién recolectados (Figura 4.19) fue de $35,03 \pm 2,05$ mg de ácido gálico/100g PS, incrementándose significativamente ($p \leq 0,05$) después de una semana de conservación en frío a 1°C , con valores de $45,93 \pm 3,23$ mg de ácido gálico /100g PS. Los niveles de polifenoles de la piel de los calabacines tratados con etileno o 1-MCP también se incrementaron después de una semana de almacenamiento, alcanzando niveles similares a los controles, en torno a 45 mg/100g PS. Según la dinámica de respuestas al estrés propuesta por Toivonen (2004) (Tabla 4.1), en esta primera semana nos encontraríamos con los estados I y II en los que se produciría la alarma, la producción de ROS y como consecuencia una serie de modificaciones en el metabolismo celular, incluyendo el aumento de la protección de los sistemas antioxidantes para aliviar la respuesta al estrés.

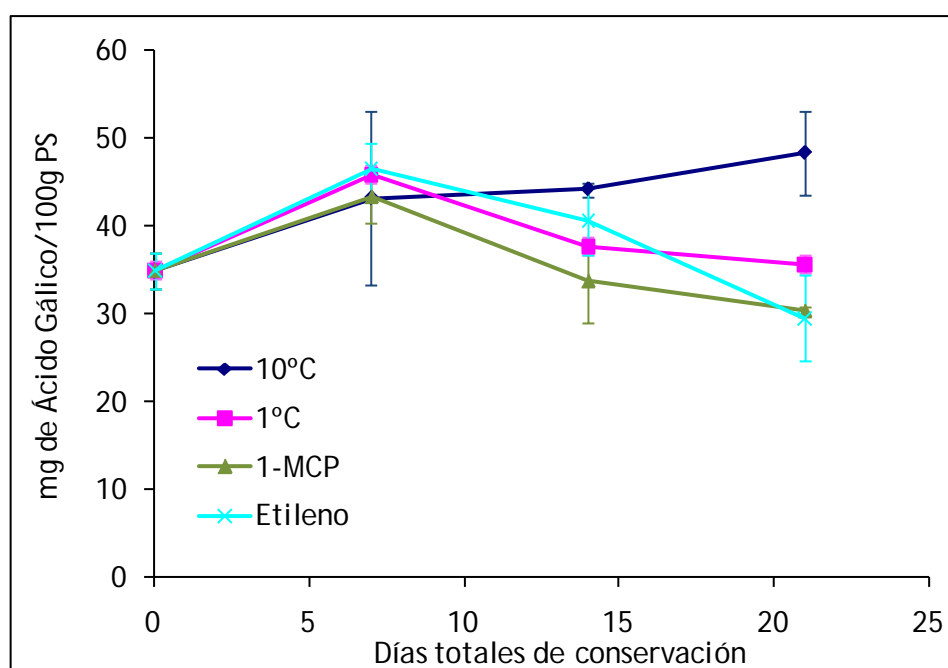


Figura 4.19. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre el contenido en fenoles totales en la piel. $LSD_{0,05}=5,56$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

Algunos autores (Pérez-Tello *et al.*, 2001), atribuyen el aumento del contenido en compuestos fenólicos en frutos sensibles a DF cuando son sometidos a bajas temperaturas, a un incremento en la actividad PAL (primera enzima de la ruta de síntesis de compuestos fenólicos) como consecuencia del daño. Otros estudios parecen indicar que el aumento de la actividad PAL durante el almacenamiento a bajas temperaturas, es un mecanismo de

defensa frente a los DF más que la causa (Lafuente *et al.*, 2001) y, que además está relacionado con la disminución de DF en distintos frutos (Wang *et al.*, 2007).

A partir de la primera semana de almacenamiento, este parámetro siguió una evolución diferente en los frutos conservados a temperatura de no daño (10°C) y los frutos conservados a 1°C. A 10°C los niveles de polifenoles aumentaron ligeramente durante toda la experiencia, mientras que la tendencia de los frutos mantenidos a 1°C fue a una disminución conforme aumentó el periodo de almacenamiento. Así, el contenido en polifenoles de la piel de los calabacines conservados a 1°C, pasó de $45,93 \pm 3,23$ mg de ácido gálico/100g PS después de 7 días de conservación, a $35,67 \pm 0,83$ mg/100g PS dos semanas más tarde. Los tratamientos con 1-MCP o etileno agravaron significativamente ($p \leq 0,05$) la disminución de polifenoles en la piel de los frutos llegando, tras 21 días de almacenamiento, a niveles inferiores a 30 mg/100g PS. Esta fase coincidiría con el estado III de la clasificación de Toivonen (2004) de la dinámica de respuestas al estrés. Es decir, cuando el factor que causa el estrés continúa, el sistema es sobrepasado y puede ocurrir daño celular y subcelular causando, entre otras alteraciones, la pérdida de antioxidantes no enzimáticos, cambios en la permeabilidad de la membrana y a veces síntomas visibles de lesión.

El contenido en polifenoles en la pulpa de los calabacines (Figura 4.20) conservados a temperatura de no daño (10°C) mostró una tendencia similar a la piel, aunque mucho menos marcada. Así, el contenido en fenoles de la pulpa de los frutos control se incrementó desde $28,32 \pm 1,81$ que presentaron los frutos recién recolectados hasta $32,37 \pm 2,92$ mg de ácido gálico/100g PS después de una semana de conservación y se mantuvo constante durante toda la experiencia. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en la piel, la conservación a 1°C y los tratamientos con 1-MCP o etileno no agravaron la pérdida de polifenoles en la pulpa, ya que este parámetro siguió una tendencia similar a los frutos control. Por tanto, se podría decir, siguiendo la clasificación de Toivonen (2004) de la dinámica de respuestas al estrés, que la incidencia del frío es más baja en la pulpa y se mantendría durante todo el periodo de almacenamiento en el estado II de resistencia.

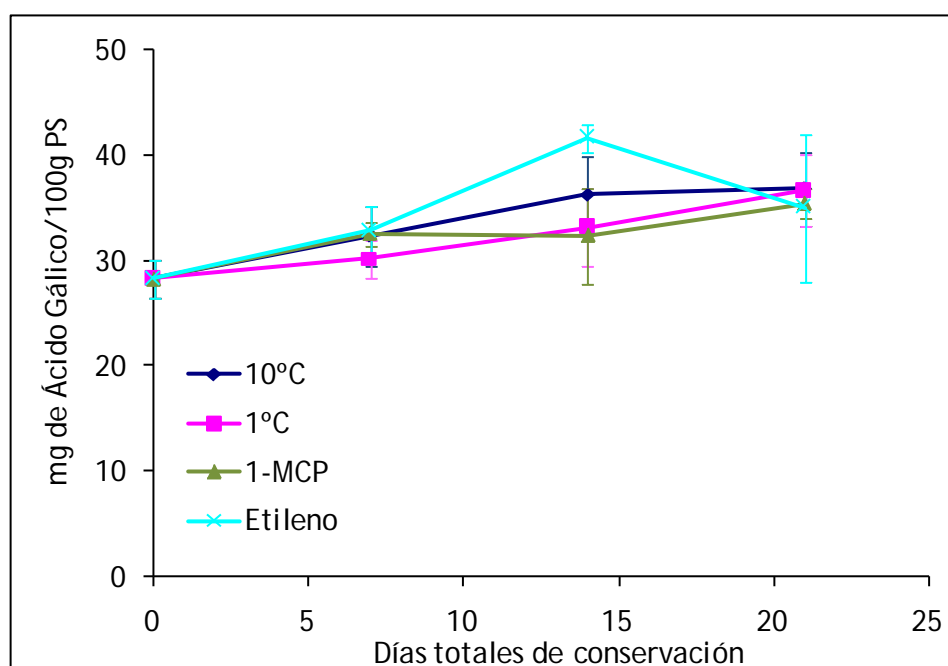


Figura 4.20. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre el contenido en fenoles totales en la pulpa. $LSD_{0,05}=4,57$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

La evolución del contenido en compuestos fenólicos en la piel de la chirimoya durante la conservación se muestra en la **Figura 4.21**. Este parámetro aumentó ligeramente en los frutos almacenados a temperatura de no daño (12°C) tras 5 días, disminuyendo progresivamente durante todo el periodo de conservación. Los frutos tratados con etileno y almacenados a bajas temperaturas (4°C) presentaron un patrón de comportamiento fenólico similar al de los frutos control almacenados a 12°C. Este comportamiento coincide con el observado en la experiencia anterior en calabacín, encontrándonos durante esos primeros días con los estados I y II según la clasificación de Toivonen (2004).

Sin embargo, la disminución de los polifenoles en la piel de los frutos conservados a 12°C pudo ser consecuencia de la maduración, como se observó en la evolución de los parámetros fisiológicos (**Figuras 4.4 y 4.5**), (los frutos conservados a temperatura de daño, no maduraron). Por tanto, aunque el perfil de comportamiento fenólico fue similar en ambos casos, (12°C y Etileno) las causas podrían ser diferentes y la fuerte disminución de compuestos fenólicos de los frutos conservados a 4°C, tratados previamente con etileno, podría deberse a una reacción de estrés. Apoyando nuestros resultados, se sabe que el nivel de acumulación de especies reactivas de oxígeno responsables de algunos de los daños producidos por las bajas temperaturas en las plantas, está limitado por la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, el ascorbato o los compuestos

fenólicos (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008). Según la clasificación de Toivonen (2004) de la dinámica de respuestas al estrés, la fuerte disminución de compuestos fenólicos podría deberse al paso del estado II de resistencia o aclimatación durante los primeros 5 días de almacenamiento en frío, al estado III de colapso en la que disminuyen los antioxidantes no enzimáticos, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos. Este resultado es interesante ya que probablemente los tratamientos con etileno sean efectivos para prevenir los daños por frío si no se prolonga en más de una semana el almacenamiento a temperatura de daño, antes de que los frutos entren en la fase III de colapso.

Sin embargo, los niveles de polifenoles de los frutos almacenados a 4°C, tanto los controles como en los frutos tratados con 1-MCP, presentaron una ligera disminución tras 5 días de conservación que se mantuvo prácticamente estable hasta el final de la experiencia. Este comportamiento también podría estar asociado con la participación de los polifenoles en los mecanismos de defensa frente a especies reactivas de oxígeno generadas como respuesta a un estrés por bajas temperaturas ya que, como se dijo anteriormente, estos se oxidan preferentemente frente a los constituyentes del alimento o los compuestos celulares y tejidos (Robards *et al.*, 1999).

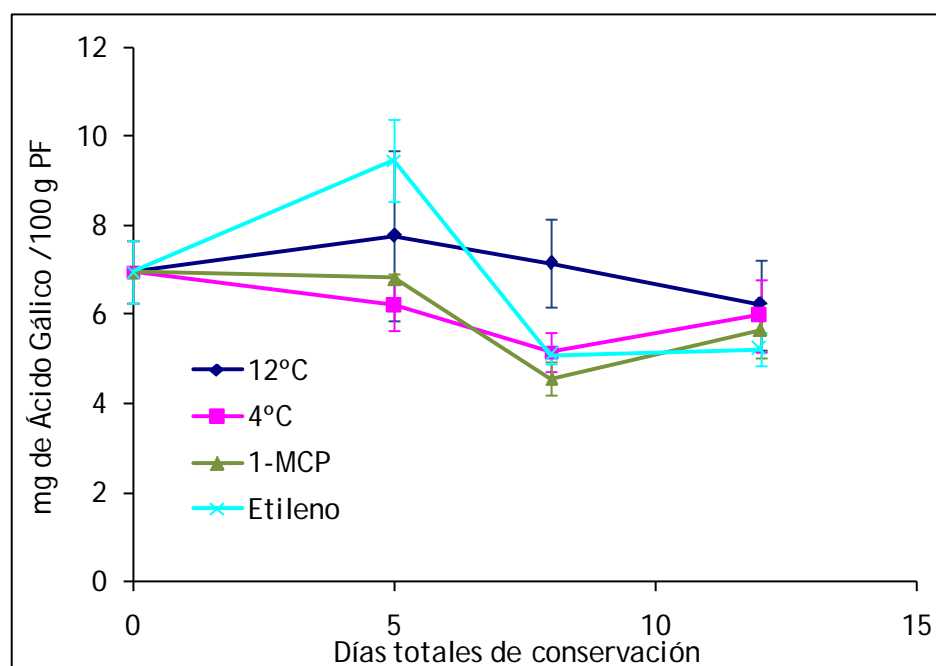


Figura 4.21. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre el contenido en fenoles totales en la piel. $LSD_{0,05}=1,16$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

En la **Figura 4.22** se recoge la evolución de los polifenoles totales en la pulpa de chirimoya. Los valores encontrados son ligeramente inferiores a los correspondientes en la piel, siendo del orden de 2,5 mg/100g PF y se mantienen durante la conservación dentro de márgenes estrechos, oscilando entre 4 y 5 mg de ácido gálico /100g PF. En los frutos control conservados a 12°C se apreció una disminución inicial a los 5 días de conservación para posteriormente aumentar con la maduración, alcanzando el mismo nivel de compuestos fenólicos que el control inicial. La evolución de este parámetro presentó ligeras diferencias entre tratamientos para los frutos almacenados a 4°C con tratamientos de 1-MCP y etileno, con un aumento a los 5 días de conservación en los tratados y un mantenimiento en los controles, aunque al final de la conservación todos ellos alcanzan el mismo valor. En la pulpa no se apreciaron diferencias significativas en el contenido de polifenoles entre las distintas temperaturas de conservación y los tratamientos.

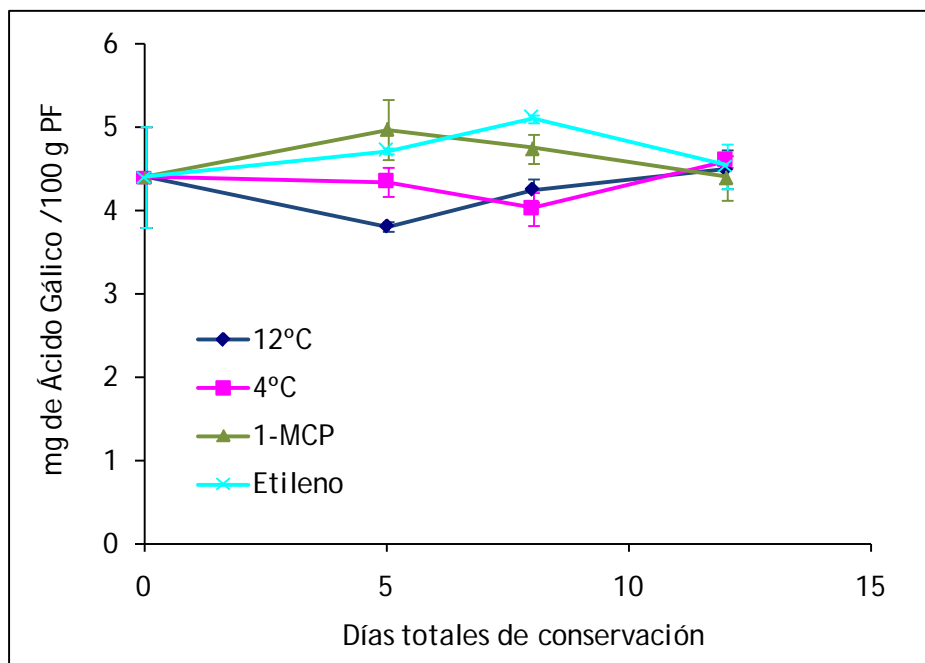


Figura 4.22. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre el contenido en fenoles totales en la pulpa. $LSD_{0,05}=0.5$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Estado	Estado fisiológico	Ejemplos de mediciones indicativas del estado
I	Reacción de alarma	Explosión oxidativa, producción creciente de los aniones de superóxido, creciente producción de peróxido de hidrógeno.
II	Resistencia o aclimatación	Modificación de la expresión de genes, aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes, aumento de antioxidantes no enzimáticos, producción de las proteínas del choque del calor
III	Colapso o agotamiento	Daño en DNA/RNA, aumento de la peroxidación lipídica, pérdida de actividades enzimáticas antioxidantes, pérdida de antioxidantes no enzimáticos, aumento de la permeabilidad de la membrana, síntomas visibles de lesión

Tabla 4.1.- Características de la respuesta al estrés oxidativo. Toivonen 2004

4.3.2 Contenido en ácido ascórbico libre

Las Figuras 4.23 y 4.24 muestran la evolución del contenido en ácido ascórbico libre de la piel y la pulpa respectivamente de calabacines conservados a temperaturas de 10 y 1°C y tratados con 1-MCP y etileno. En la piel, antes de iniciar el proceso de conservación, los calabacines presentaron $4,10 \pm 1,10$ mg/100g PS de ácido ascórbico libre. La conservación a 10°C mantuvo el contenido de esta vitamina durante la primera semana en los niveles iniciales, disminuyendo ligeramente durante la conservación. Los niveles de ácido ascórbico en los calabacines a 10°C, fueron significativamente ($p \leq 0,05$) más altos durante toda la experiencia que en los frutos conservados a 1°C, sin tratar y tratados con 1-MCP y etileno. Después de una semana de conservación, esta vitamina en la piel de los calabacines, alcanzó valores de $1,47 \pm 0,05$; $1,16 \pm 0,11$ y $1,30 \pm 0,22$ mg de ácido ascórbico libre/100g PS en los frutos conservados a 1°C, los tratados con 1-MCP y los tratados con etileno, respectivamente y se mantuvieron entorno a esos valores durante todo el periodo de almacenamiento. No se apreció ningún efecto significativo ($p \leq 0,05$) de los tratamientos sobre los niveles de ácido ascórbico en la piel. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros productos hortofrutícolas, tales como la patata dulce, la banana y la piña. Estos frutos son susceptibles de sufrir daños por frío y se pueden acelerar las pérdidas en ASC cuando son almacenados a bajas temperaturas (Miller, 1989). En esta situación la destrucción de ASC puede tener lugar incluso antes de que se detecte algún síntoma del daño por frío.

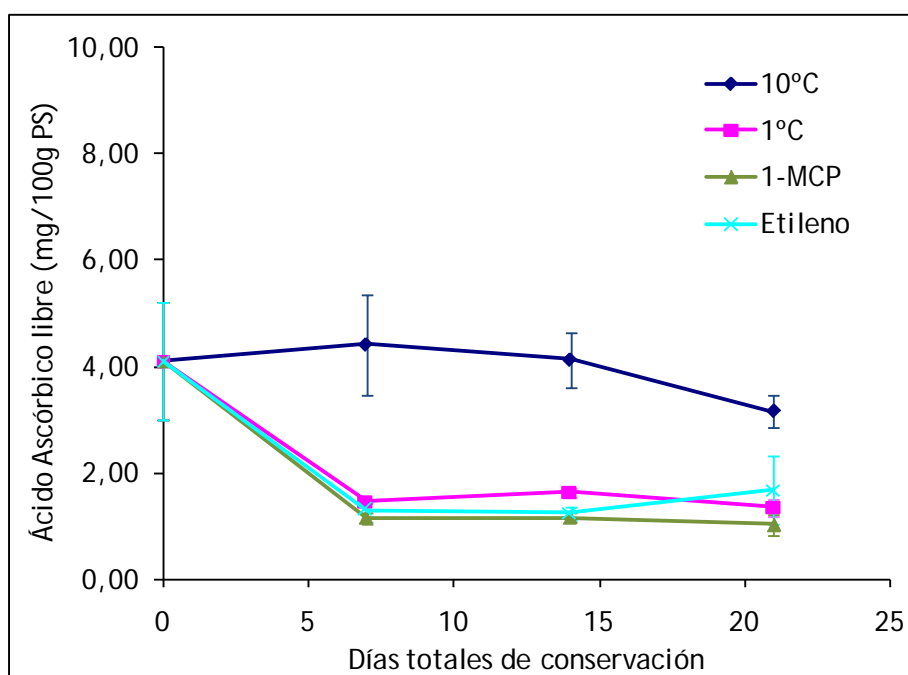


Figura 4.23. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre el contenido en ácido ascórbico libre en la piel. $LSD_{0,05}=0,94$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

El contenido en ácido ascórbico libre de la pulpa de calabacín (Figura 4.24) fue muy superior al contenido de la piel, situándose los valores iniciales en $17,19 \pm 0,19$ mg/100g PS. A 10°C, temperatura que no causa daños por frío en calabacines, este parámetro se incrementó ligeramente hasta los catorce días de conservación.

Durante la primera semana de conservación a 1°C sufrió una fuerte disminución, que es agravada por los tratamientos y al cabo de 14 días los niveles de vitamina C se incrementaron significativamente. En este sentido, la vulnerabilidad de las diferentes frutas y productos hortícolas a sufrir pérdidas oxidativas de ácido ascórbico varía enormemente entre unos y otros (Shewfelt, 1990), y la temperatura de almacenamiento es uno de los factores poscosecha que más va a influir en el contenido de ASC del fruto durante su almacenamiento. Por ejemplo, en un estudio de conservación de frutos rojos, se observó que el contenido en ASC de fresas y arándanos, se mantuvo prácticamente constante durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (0, 10, 20, 30°C), mientras que en frambuesa se detectaron pérdidas mayores conforme aumentó la temperatura de almacenamiento (Kalt *et al.*, 1999).

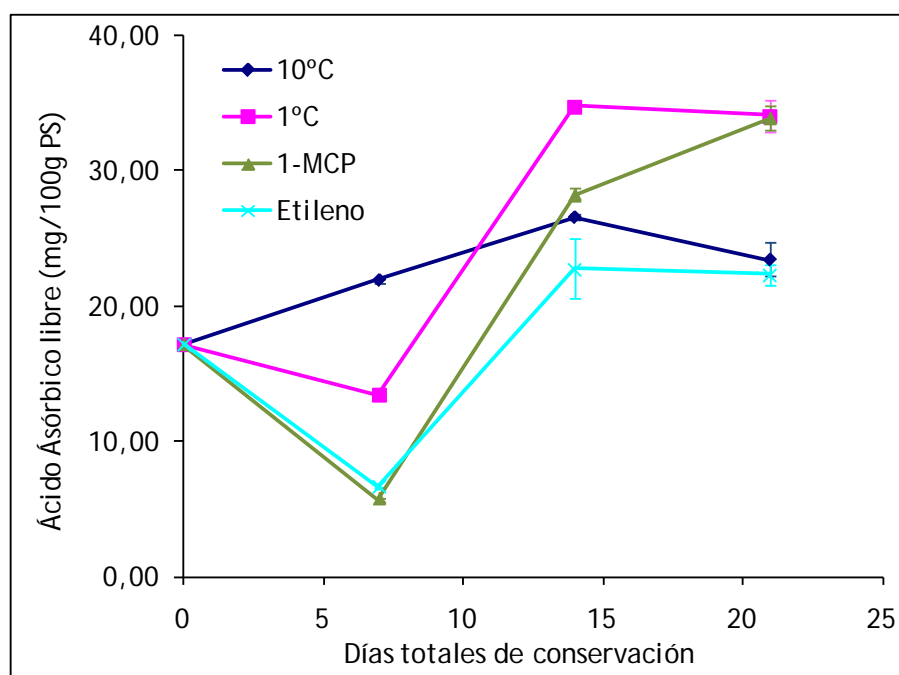


Figura 4.24. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre el contenido en ácido ascórbico libre en la pulpa. $LSD_{0,05}=1,18$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

La evolución del contenido en ácido ascórbico libre en la piel y la pulpa de la chirimoya fue muy diferente a la evolución que siguió en calabacín. En el inicio de la experiencia, la piel presentó $3,83 \pm 0,39$ mg/100g PS de ácido ascórbico libre (Figura 4.25). Se apreció un ligero incremento de los niveles de ácido ascórbico libre a los 5 días de almacenamiento con todos los tratamientos, para posteriormente disminuir hasta el final de la experiencia. Este comportamiento podría deberse a diferentes causas, por una parte una reacción de estrés durante los primeros 5 días de almacenamiento en frío, tanto a temperatura de no daño (12°C) como a temperatura de daño (4°C), coincidiendo con el estado I y II de la clasificación de la dinámica de las respuestas al estrés según Toivonen (2004). Los tratamientos con 1-MCP y etileno no modificaron la respuesta de estrés en piel de chirimoya. La disminución del ácido ascórbico libre en piel de los frutos conservados a 12°C podría deberse a una disminución propia de la maduración de los frutos (Muñoz *et al.*, 2004), mientras que la disminución de este parámetro en la piel de los frutos almacenados a temperatura de daño (4°C) podría deberse al siguiente nivel de estado de estrés (estado III) ya que como se vio en los parámetros fisiológicos (Figuras 4.4 y 4.5), los frutos conservados en frío no llegaron a madurar.

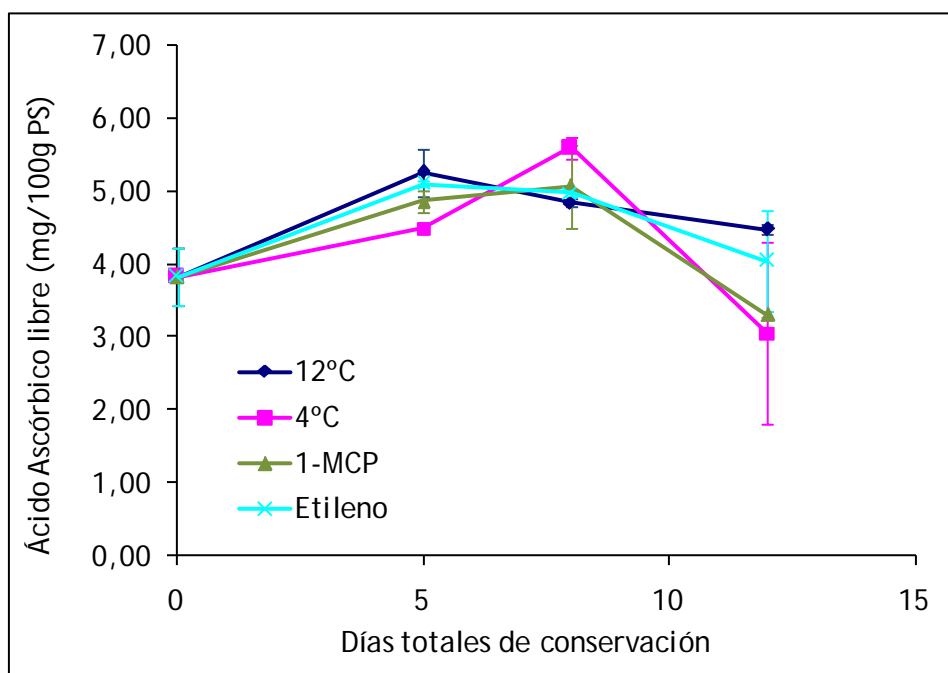


Figura 4.25. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre el contenido en ácido ascórbico libre en la piel. $LSD_{0,05}=0,64$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

El contenido en ácido ascórbico libre en la pulpa (Figura 4.26) de la chirimoya fue muy superior al encontrado en la piel, con niveles iniciales de $10,55 \pm 0,92$ mg de ácido ascórbico libre/100g PS, casi tres veces más que en la piel (Figura 4.25). En los frutos conservados a temperatura de no daño (12°C), éste parámetro mostró una evolución descendente, con una caída más acusada a los 5 días de conservación, alcanzando al final de la experiencia los $4,27 \pm 0,06$ mg/100g PS. Esta disminución se debe al proceso de maduración que experimenta la chirimoya ya que se suele dar en la mayoría de los frutos. En los frutos conservados a 4°C, que como se ha indicado precedentemente, presentaron una maduración anómala, la evolución del ácido ascórbico libre fue diferente, ya que tras una caída a los 5 días de almacenamiento, en los controles y en los tratados con 1-MCP y etileno, este parámetro experimentó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) alcanzando al final de la experiencia $12,14 \pm 1,66$; $15,63 \pm 0,11$ y $18,19 \pm 1,18$ mg de ácido ascórbico libre/100g PS, respectivamente, para los tratados con etileno, 1-MCP y control. Este fuerte incremento de ácido ascórbico libre podría deberse a una respuesta de defensa frente al estrés oxidativo causado por la maduración anómala. Los tratamientos con 1-MCP y etileno no modifican la respuesta de estrés frente al control a 4°C.

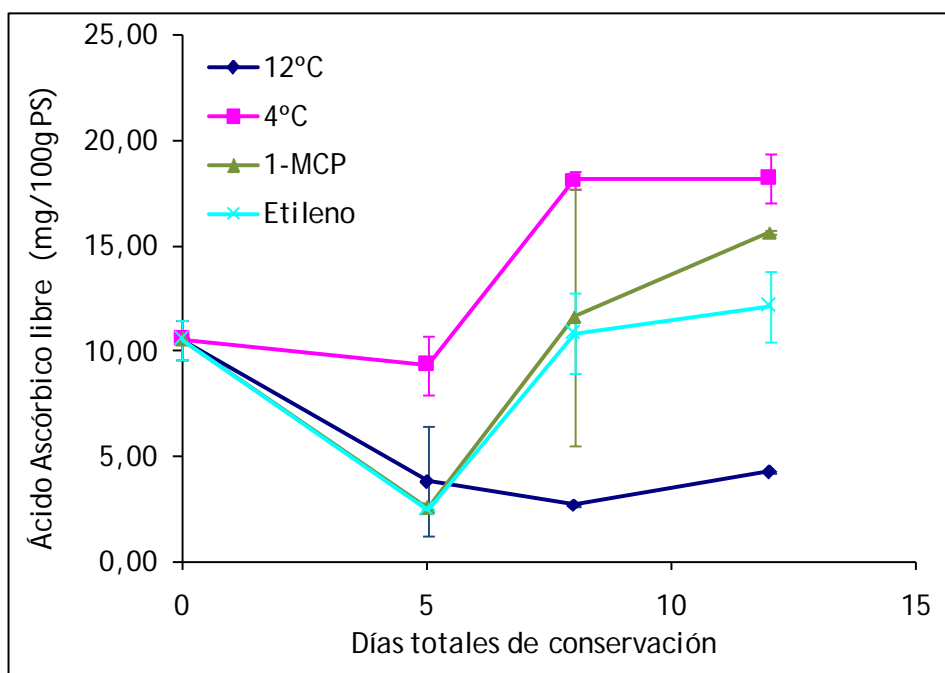


Figura 4.26. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre el contenido en ácido ascórbico libre en la pulpa. $LSD_{0,05}=2,75$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

4.3.3.-Capacidad antioxidante total en equivalentes de Trolox(TEAC)

Los valores TEAC pueden ser asignados a todos los compuestos capaces de captar el radical anión $ABTS^{\cdot-}$, por comparación de su capacidad de captación con la mostrada por el Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E) (Van den Berg *et al.*, 1999). De esta forma se da un valor cuantitativo a la capacidad antioxidante de las muestras, determinando qué concentración (μM) de Trolox tendría una actividad antioxidante equivalente a la del compuesto analizado.

La capacidad antioxidante de la piel del calabacín (Figura 4.27) se incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) en los frutos conservados a 10°C durante la primera semana de conservación, pasando de $15,76 \pm 0,91 \mu mol.g^{-1}$ PS al inicio de la experiencia, a casi el doble ($26,01 \pm 3,35 \mu mol.g^{-1}$ PS) una semana después. A esta temperatura, la capacidad antioxidante se mantuvo elevada durante la conservación, aunque fue disminuyendo progresivamente, hasta alcanzar un valor de $21,41 \pm 1,54 \mu mol.g^{-1}$ PS después de 21 días de almacenamiento. Por otra parte, aunque la capacidad antioxidante de la piel de los calabacines conservados a 1°C también se incrementó después de una semana de conservación, el incremento de este parámetro cuando los frutos fueron tratados con 1-MCP o etileno fue significativamente inferior a los que se mantuvieron a 1°C sin tratamientos. Este comportamiento podría deberse a una respuesta de estrés debida a las bajas temperaturas, coincidiendo con el estado I de la clasificación de Toivonen (2004).

Las diferencias observadas podrían interpretarse como un efecto protector del etileno y el 1-MCP frente a los daños por frío o, por el contrario, los tratamientos podrían bloquear los sistemas de defensa y disminuir por tanto la capacidad antioxidante.

Paralelamente a la producción de especies reactivas de oxígeno, las plantas se protegen de los efectos mediante un sistema antioxidante complejo que incluye las síntesis de metabolitos antioxidantes como ascorbato, glutatión o α -tocoferol (Mittler, 2002) e incluso se ha descrito que también las poliaminas contribuyen a incrementar la capacidad antioxidante en situaciones de estrés (Serrano *et al.*, 1996). Los valores TEAC de la piel de los frutos disminuyeron progresivamente después de la primera semana a 1°C, tanto los frutos control, como los que fueron tratados previamente con 1-MCP o etileno, llegando a valores TEAC de $11,66 \pm 0,8$; $10,14 \pm 1,01$ y $10,6 \pm 0,23 \mu\text{mol.g}^{-1}$ PS respectivamente. Como se observa también en la evolución de los polifenoles (Figura 4.19), esta fase se correspondería con el estado III de la clasificación de Toivonen (2004), en la que se produce la pérdida de antioxidantes no enzimáticos.

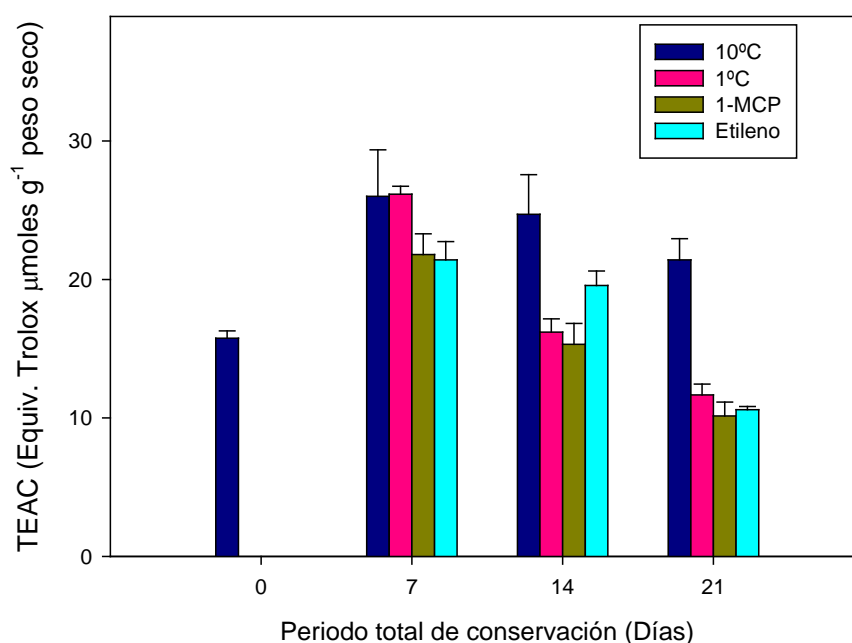


Figura 4.27. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la capacidad antioxidante TEAC (Equivalentes de Trolox $\mu\text{mol.g}^{-1}$ peso seco) en la piel. $LSD_{0,05}=3,49$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

La pulpa de calabacín (Figura 4.28) presentó una capacidad antioxidante mucho más baja que la piel y no se modificó significativamente ($p \leq 0,05$) durante la conservación a 10°C, ya que se mantuvo entre $2,17 \pm 0,28 \mu\text{mol.g}^{-1}$ PS tras la recolección y $2,96 \pm 0,52 \mu\text{mol.g}^{-1}$ PS después de 21 días. Por otra parte, la capacidad antioxidante de la pulpa de los calabacines que fueron almacenados a 1°C se mantuvo en niveles similares a

los calabacines conservados a 10°C hasta que a los 21 días, este valor, se incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) llegando a $6,45 \pm 0,40 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. Este aumento podría ser debido a una reacción de estrés, que apareció 14 días más tarde que en la piel. Los tratamientos con 1-MCP y etileno incrementaron ligeramente la capacidad antioxidante de la pulpa.

En la bibliografía son escasos los estudios que han evaluado la actividad antioxidante de frutos no climatéricos tratados con etileno o 1-MCP. En algunos estudios se ha obtenido una buena correlación ($r = 0,71$) entre el valor antioxidante total en equivalentes de Trolox y su contenido en determinados compuestos antioxidantes, encontrándose que el 71% de la capacidad antioxidante resultaba de la contribución de los compuestos fenólicos, y el 29% de la presencia de otros compuestos antioxidantes como carotenoides y vitaminas entre otros (Javanmardi *et al.*, 2003). En nuestro trabajo se encontró que la respuesta ante el estrés provocado por bajas temperaturas en los frutos de calabacín, fue siempre mayor en piel que en pulpa ya que es en la piel donde se desarrolla principalmente la fisiopatía de los daños por frío. Se encontró cierta correlación entre la disminución de los compuestos antioxidantes y la disminución de la capacidad antioxidante total.

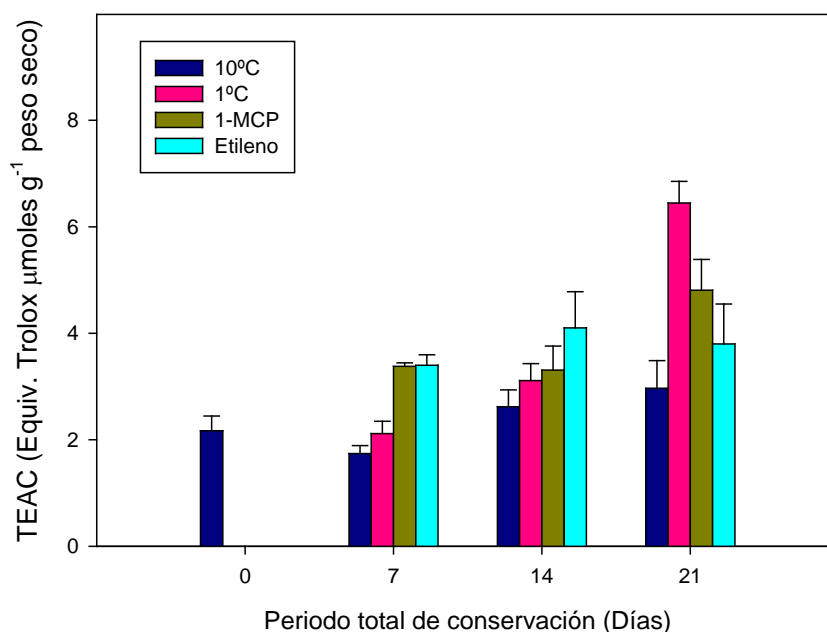


Figura 4.28. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la capacidad antioxidante TEAC (Equivalentes de Trolox $\mu\text{moles g}^{-1}$ peso seco) en la pulpa. $LSD_{0,05}=0,59$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

La Figura 4.29 muestra la capacidad antioxidante en valores TEAC de la piel de chirimoyas conservadas a 4°C, tratadas previamente con 1-MCP y etileno. La capacidad antioxidante se incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) en la piel de las chirimoyas conservadas a 12°C durante la conservación, llegando a valores TEAC de $650 \pm 37,35 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{PS}$ a los 12 días. En la piel de las chirimoyas conservadas a 4°C también se incrementó su capacidad antioxidante desde la primera semana de conservación, aunque el incremento fue significativamente inferior que en los controles a 12°C. Este comportamiento podría deberse al efecto de la maduración. Los compuestos antioxidantes que determinan la actividad antioxidante total y que se encuentran en frutas, son la vitamina C, los compuestos fenólicos y los carotenoides. En la mayoría de los casos, los compuestos fenólicos aumentan durante el desarrollo del fruto, para posteriormente, disminuir o permanecer constantes durante la maduración del mismo.

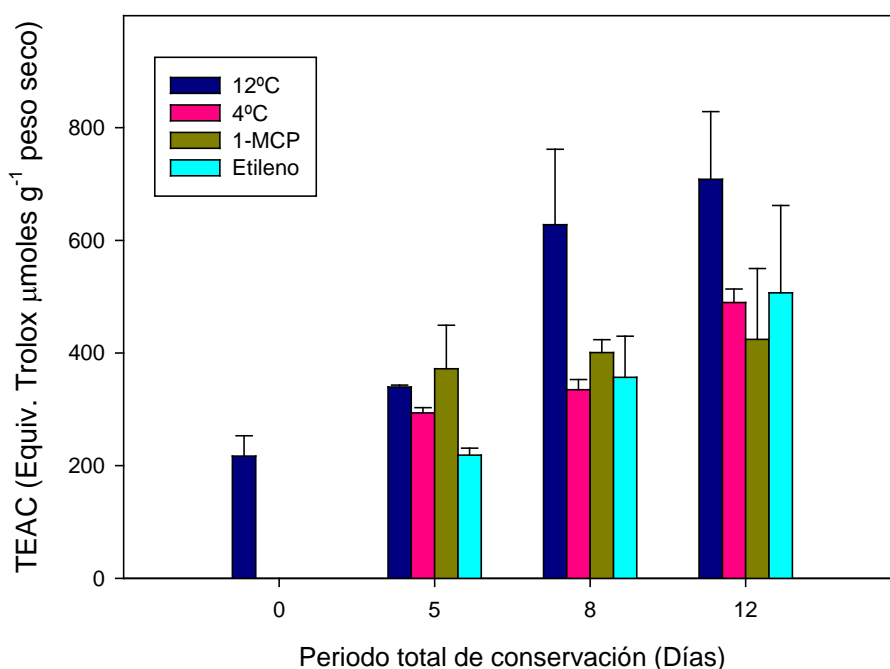


Figura 4.29. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la capacidad antioxidante, TEAC (Equivalentes de Trolox $\mu\text{moles g}^{-1}$ peso seco) en la piel. $LSD_{0,05}=149,16$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

Aunque, como hemos comentado anteriormente, en algunos estudios se ha obtenido una buena correlación entre el valor antioxidante total en equivalentes de Trolox y su contenido en determinados compuestos antioxidantes (Javanmardi *et al.*, 2003), en nuestro estudio, a pesar de encontrar un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de los niveles de TEAC de la piel de chirimoya conservada a 12°C, éste no se correlacionó con un aumento en compuestos fenólicos (Figura 4.21). Por lo que es probable que en la piel de chirimoya existan algunos compuestos fenólicos que no se cuantifiquen con la técnica

utilizada en este trabajo, o bien sean otros compuestos antioxidantes, como carotenoides, los responsables del aumento de la capacidad antioxidante en los frutos conservados a 12°C.

En la Figura 4.30 se muestra la capacidad antioxidante en valores TEAC de la pulpa de chirimoyas conservadas a 4°C, tratadas previamente con 1-MCP y etileno. La capacidad antioxidante de la pulpa de chirimoya siguió un patrón completamente distinto a la piel, ya que disminuyó considerablemente durante su almacenamiento a 12 °C, pasando de un valor TEAC de 122.82 ± 3.8 a $63.85 \pm 2.24 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PS después de 12 días de almacenamiento. Como se ha comentado anteriormente, el desarrollo de los DF en chirimoya consiste en alteraciones del desarrollo como, la maduración incompleta y aroma y sabor insuficientes. La capacidad antioxidante de la pulpa de chirimoya se mantuvo constante en los niveles iniciales durante el almacenamiento en frío (4°C), coincidiendo con los resultados de todos los parámetros indicadores de maduración.

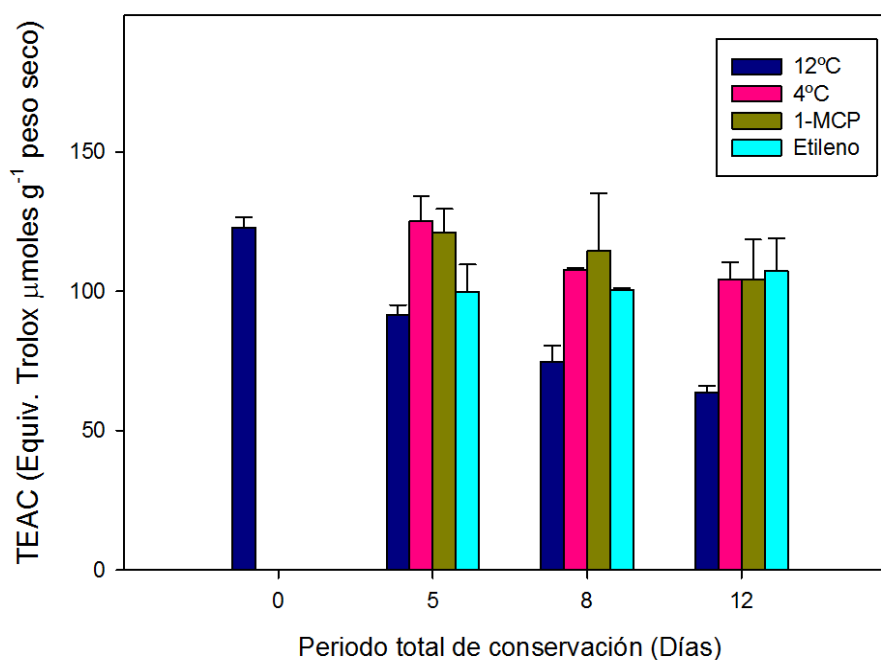


Figura 4.30. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la capacidad antioxidante, TEAC (Equivalentes de Trolox $\mu\text{moles g}^{-1}$ peso seco) en la pulpa. $LSD_{0,05}=32,64$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

Por tanto, se puede considerar que el frío afecta de forma diferente a la piel y la pulpa de chirimoya. La piel en los frutos conservados a 12°C sufre un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de la capacidad antioxidante, paralelo a la maduración y al pardeamiento de la piel. Esta capacidad antioxidante se reduce con el frío, aunque no se ve afectada por los tratamientos con 1-MCP y etileno. Sin embargo, el tiempo de

almacenamiento a 12°C disminuye la capacidad antioxidante de la pulpa, al tiempo que avanza la maduración, mientras que la capacidad antioxidante de la pulpa de los frutos almacenados en frío se mantiene en los niveles iniciales. Los tratamientos con 1-MCP y etileno no modifican los niveles TEAC.

4.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Hoy día se considera que en la maduración y senescencia de los frutos están implicados procesos oxidativos (Brennan y Frenkel, 1977). La maduración de la fruta se ha definido como un fenómeno oxidativo en el que se generan radicales libres o especies reactivas de oxígeno como productos normales del metabolismo. Sin embargo, un fuerte aumento en la concentración de estas sustancias puede originar graves consecuencias en los tejidos celulares de la planta, ya que pueden interaccionar y modificar casi cualquier molécula orgánica con la que contacta (lípidos, hidratos de carbono y ADN), pudiendo llevar a la muerte celular (Aruoma, 1994). El proceso de senescencia está íntimamente relacionado con un aumento en la concentración de radicales libres, de la misma forma que diversas situaciones de estrés como bajas temperaturas, herbicidas, sequía, salinidad, etc. pueden provocar una producción masiva de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, acelerando los procesos de maduración y senescencia (Lacan y Baccou, 1998; Scabba *et al.*, 2001).

Para evitar estos daños, la célula ha desarrollado en las plantas, captadores de oxígeno o antioxidantes, vías metabólicas de detoxificación enzimática y mecanismos de reparación. Así, se conocen ciertos sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, enzimas del ciclo ascorbato-glutation, etc. que cumplen estos propósitos (Halliwell, 1996). Será por ello importante mantener un equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes que los eliminen del organismo.

Dentro de los sistemas de detoxificación enzimáticos, la catalasa y el ciclo ascorbato-glutation son importantes en la captación de H₂O₂ aunque sus propiedades, necesidades y sus funciones son paralelas. Así, la catalasa no necesita poder reductor y tiene una gran velocidad de reacción y una baja afinidad para el peróxido de hidrógeno (por ello solo elimina H₂O₂ cuando hay grandes cantidades) (Willekens *et al.*, 1997). Por el contrario, la ascórbico peroxidasa requiere un reductor (ascorbato) y tiene gran afinidad para el peróxido de hidrógeno llevando a cabo captaciones de pequeñas cantidades de H₂O₂ en localizaciones específicas. Su capacidad antioxidante es dependiente de la severidad del estrés así como de las especies y de su estado de desarrollo.

La ascorbato peroxidasa es por otro lado el más importante captador de peróxido de hidrógeno de la célula vegetal; forma parte, junto con la glutathione reductasa y la

dehidro ascorbato reductasa, del ciclo ascorbato-glutation. Se ha relacionado esta enzima con los procesos de maduración en *Capsicum annuum*, encontrándose un aumento de su actividad en los cromoplastos del pimiento maduro (Sánchez-Bel *et al.*, 2012).

Las SOD catalizan la dismutación del ión superóxido O_2^- a H_2O_2 (Bowler *et al.*, 1994; Van Camp *et al.*, 1994) protegiendo a las células de los efectos tóxicos de este ión producido en diferentes lugares celulares. Se ha podido comprobar la influencia de esta enzima en los procesos de senescencia de ciertos frutos durante el almacenamiento. En efecto, se ha encontrado que la vida comercial útil de algunas variedades de melón está relacionado con los niveles de los enzimas antioxidantes SOD, catalasa y peroxidasa.

4.4.1.- Evolución de la actividad catalasa

La enzima catalasa es uno de los sistemas más eficientes para la eliminación de los radicales libres de oxígeno (Scandalios, 1993). Se encuentra principalmente en las mitocondrias y peroxisomas y cataliza la reacción de transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Se ha descrito que durante el desarrollo de la fisiopatía de los daños por frío, esta enzima es una de las primeras en activarse como respuesta al estrés oxidativo. De hecho, la activación de la isoforma CAT1 se ha postulado como la clave de la activación de los sistemas antioxidantes enzimáticos para responder al estrés oxidativo (Sevillano *et al.*, 2009).

En la piel del calabacín (**Figura 4.31A**) se registró una activación de la actividad catalasa como respuesta al estrés oxidativo inducido por bajas temperaturas. Esta activación se potenció con los tratamientos, 1-MCP y, especialmente, con etileno. El perfil de actividad catalasa en este tejido, mostró un aumento a partir de 7 días de conservación, que alcanzó un valor máximo una semana después, disminuyendo a continuación hasta el día 21. Concretamente, las muestras almacenadas a 1°C pasaron de $187,44 \pm 12,02$ UE/mg proteína en el inicio de la conservación, a $787,50 \pm 126,3$ UE/mg proteína, al cabo de 14 días. El tratamiento con etileno originó un máximo de $1506,14 \pm 200$ UE/mg proteína el día 14, frente a las $187,44 \pm 12,02$ UE/mg proteína iniciales. En las muestras control a 10°C la actividad se mantuvo baja hasta el día 14, aumentando al final de la experiencia, debido probablemente a que ya se encontraban en fase de senescencia. A los 21 días la actividad catalasa de todas las muestras fue similar, en torno a 800 UE/mg proteína.

El perfil de la actividad catalasa en piel de calabacín se ajusta a la dinámica de las respuestas al estrés propuesta por Toivonen (2004), ya que la primera semana coincidiría con el estado I o fase de alarma en la que se producen ROS y como consecuencia, se inicia un sin número de modificaciones en el metabolismo celular, incluyendo el aumento de la actividad catalasa, llegando al máximo de actividad una semana después que coincidiría con el Estado II.

El paralelismo que se observa entre el perfil de los daños por frío en piel de calabacín a la salida de cámara de 1°C (**Figura 4.3A**), con el perfil de la actividad catalasa (**Figura 4.31A**) hace pensar que la acción de la catalasa en este tejido apuntaría más a que la actividad fue una respuesta defensiva de la piel como consecuencia del daño, y no una acción preventiva, dado que la mayor actividad no se correlacionó con menor daño, o mayor tolerancia al frío. Por otro lado, la actividad catalasa en la piel de los frutos que fueron tratados previamente con 1-MCP o etileno fue más elevada que en los frutos control a 1°C, coincidiendo con un nivel de DF más severo. Por tanto, los tratamientos agravan los DF en este tejido ya que si tuvieran algún efecto positivo en los mecanismos de defensa antioxidante, sería de esperar un paralelismo entre la disminución de DF asociado a mayor actividad catalasa. Por el contrario, en ensayos realizados por otros autores sobre DF en pimiento y kiwi pusieron de manifiesto el efecto positivo de los tratamientos aplicados para reducir los daños. En estos casos se produjo una mayor actividad de enzimas detoxificantes como catalasa y peroxidasa asociada a la reducción de los síntomas del estrés por frío (Lim *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012).

Al final de la conservación la actividad disminuyó a pesar de que los daños fueron más notorios. En ese momento también fue importante el porcentaje de salida de electrolitos (**Figura 4.15**). Todo esto apunta a un alto grado de deterioro de los tejidos y la desorganización estructural, como consecuencia del daño, y la incapacidad de los mismos para responder de manera defensiva al estrés oxidativo derivado del exceso de radicales y especies reactivas de oxígeno, coincidiendo con el estado III de la dinámica de las respuestas al estrés propuesta por Toivonen (2004), en el que el sistema es sobrepasado y ocurre daño celular y subcelular.

El efecto de los tratamientos sobre la actividad catalasa fue patente en la pulpa de calabacín (**Figura 4.31B**). La aplicación de 1-MCP y etileno produjo un aumento de la actividad catalasa a los 7 días de conservación a 1°C, desde $15,67 \pm 3,04$ UE/mg proteína al inicio de la conservación hasta $108,45 \pm 9,66$ UE/mg proteína los frutos tratados con 1-MCP, y hasta $124,27 \pm 28,51$ UE/mg proteína los tratados con etileno. Estos niveles de actividad se mantuvieron estables a partir de los 7 días y durante todo el tiempo de conservación. En los frutos control almacenados a 1°C, el aumento de la actividad catalasa fue paulatino y continuó hasta los 21 días de conservación. Así pues, la pulpa de los frutos no tratados y almacenados a 1°C mostraron una respuesta frente al estrés por bajas temperaturas más tardía que los tratados.

Por tanto, podríamos decir que en esta experiencia se detectó actividad catalasa tanto en piel como en pulpa de calabacín, aunque los valores en piel fueron mucho más elevados. Durante el almacenamiento de este fruto se produjo un estrés oxidativo, que se vio reflejado en un aumento de la actividad catalasa.

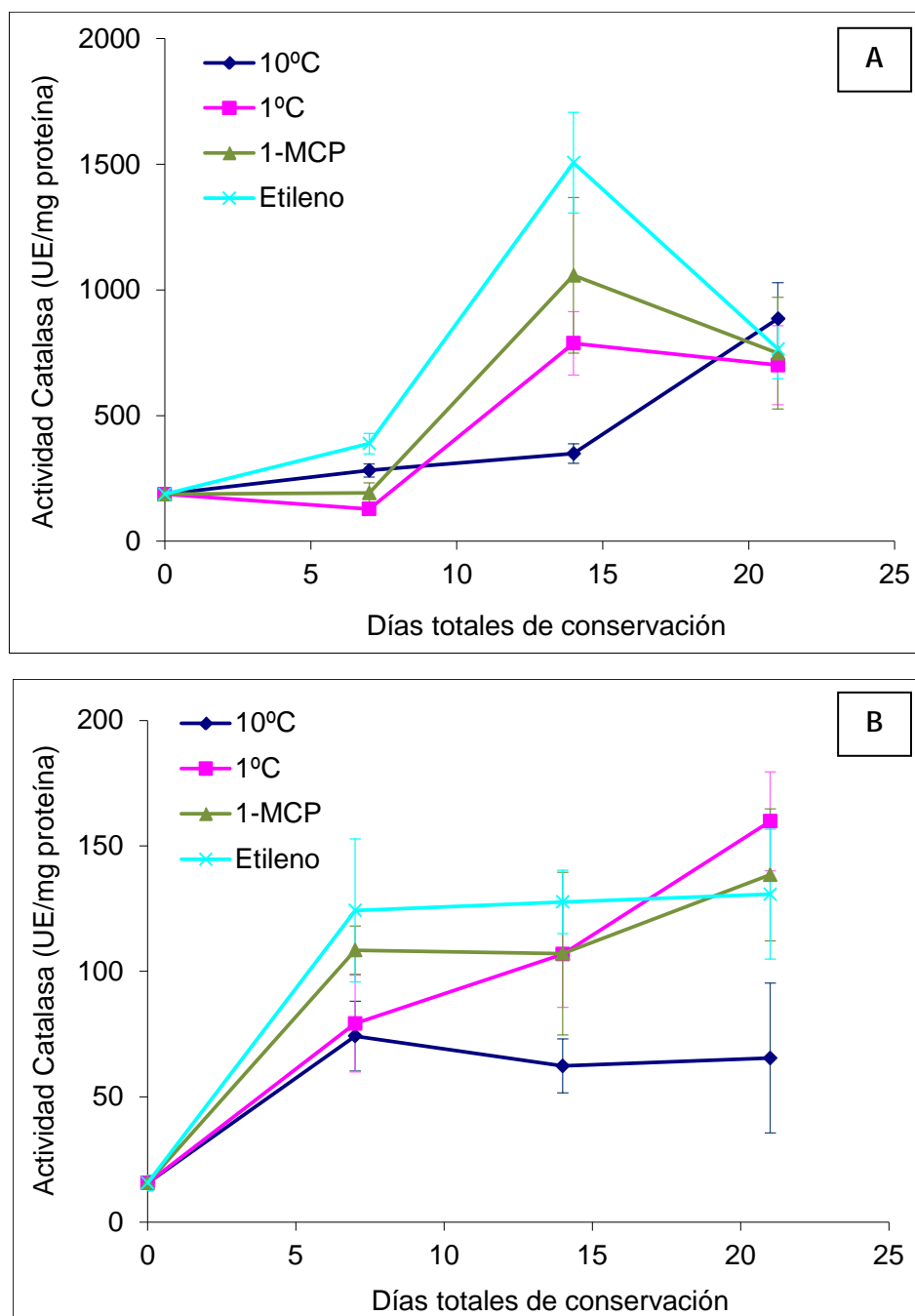


Figura 4.31. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la actividad catalasa en piel (A) $LSD_{0,05}=187,9$, y en pulpa (B) $LSD_{0,05}=28,01$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

En la experiencia realizada con chirimoya solo se obtuvo actividad catalasa en pulpa, no siendo detectable en piel (Figura 4.32). Los frutos control a 12°C mostraron un máximo de $141,46 \pm 1,44$ UE/mg proteína a los 8 días de conservación, lo que supuso un incremento entre 3 y 4 veces superior respecto a los valores iniciales. El perfil de

actividad fue paralelo al encontrado para la producción de etileno (Figura 4.8), coincidiendo ambos máximos el día 8, y es un reflejo de la capacidad celular para reducir el contenido en radicales libres que acompaña a los procesos de envejecimiento y senescencia.

La actividad catalasa aumentó a lo largo del periodo de conservación en la pulpa de las chirimoyas conservadas a 4°C, tratadas o no, siendo mayor la actividad catalasa de los frutos tratados con 1-MCP. Al final de la experiencia en los frutos control conservados a 4°C se detectó la actividad más alta, de 196,41 UE/mg proteína.

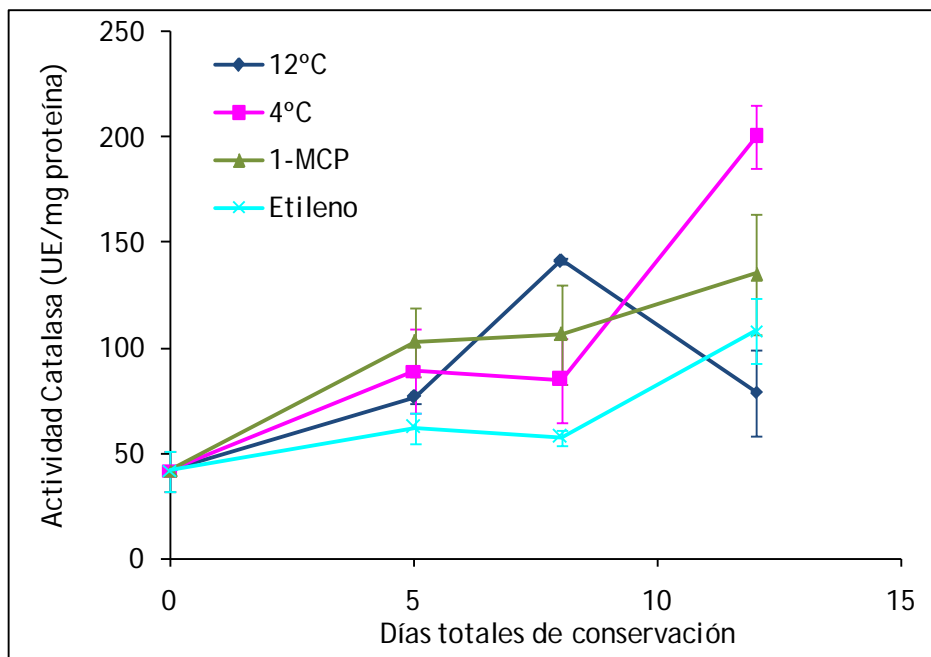


Figura 4.32. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la actividad catalasa en pulpa. $LSD_{0,05}=75$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

Como ya se expuso anteriormente, en las chirimoyas no fueron visibles los síntomas característicos de los daños por frío ni en la piel ni en la pulpa. Teniendo en cuenta los resultados de actividad catalasa encontrados en la pulpa, se puede pensar en la posible contribución de esta enzima para rebajar el estrés oxidativo. El hecho de que no se haya registrado actividad catalasa en piel apuntaría a la participación predominante de otras enzimas detoxificantes en este tejido, para prevenir los síntomas de los daños por frío.

Estos resultados obtenidos en las experiencias realizadas en la presente Memoria, concuerdan con los encontrados por otros autores que han estudiado la respuesta de los sistemas antioxidantes frente al estrés oxidativo. Así se ha podido comprobar que otros mecanismos que producen estrés oxidativo con formación de radicales libres en el fruto, tales como la exposición a radiaciones ultravioletas o al agente oxidante clorhidruro de

2,2'-diaz-(2-aminopropano), producen una mejora o aumento de la actividad de los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos tales como superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, guayacol peroxidasa y glutatión reductasa (Jain *et al.*, 2003). En otros estudios sobre calabacín almacenado a bajas temperaturas se encontró un aumento de la actividad catalasa durante todo el almacenamiento (Gualanduzzi *et al.*, 2009), y en experiencias sobre conservación de melón (Lacan y Baccou, 1998), se concluyó que la alta relación SOD/catalasa es importante y que la acción conjunta de ambas enzimas retrasa la senescencia del melón.

4.4.2.- Evolución de la actividad peroxidasa

La peroxidasa es una hemoproteína que tiene como misión transformar el peróxido de hidrógeno formado por la SOD en agua y en oxígeno, liberando así a la célula vegetal de un producto fitotóxico. En frutos se ha descrito un incremento de esta enzima durante la maduración de arándanos (Miesle *et al.*, 1991) papaya (Silva *et al.*, 1990) melocotones (Quesada *et al.*, 1992) tomates y peras, (Frenkel, 1972) y uvas (Calderón *et al.*, 1995) y en la senescencia durante el almacenamiento de melón (Lacan y Baccou, 1998).

En la **Figura 4.33** se muestra la evolución de la actividad peroxidasa en calabacín. En la piel (**Figura 4.33A**) se observó una activación de esta enzima como respuesta a un estrés por bajas temperaturas en los frutos almacenados a 1°C, pero en mayor medida en las frutos no tratados. La piel de los frutos control almacenados a 1°C presentaron un máximo de actividad a los 14 días de conservación con $42,69 \pm 10,38$ UE/mg proteína; a partir de ese punto, la actividad disminuyó ($26,86 \pm 9,5$ UE/mg proteína). En el caso de los frutos tratados con 1-MCP y etileno, la evolución en el tiempo de la actividad peroxidasa en piel fue comparable a la de los frutos control, aunque los valores fueron ligeramente más bajos, con máximos de actividad a los 14 días de $31,58 \pm 7,49$ y $26,47 \pm 6,95$ UE/mg proteína, para los frutos tratados con 1-MCP y etileno, respectivamente. También se observó un aumento de la actividad peroxidasa en la piel de los frutos control almacenados a 10°C, lo que indica que el traslado de las muestras desde temperatura ambiente a la temperatura de conservación, aunque ésta sea 10°C (temperatura a la que no se desarrollan daños por frío), pudo provocar un estrés en el fruto que se tradujo en un estrés oxidativo y un aumento de la actividad peroxidasa.

La actividad peroxidasa en pulpa de calabacín (**Figura 4.33B**) al principio de la conservación fue muy baja ($0,05 \pm 0,012$ UE/mg proteína) y aumentó al someter los calabacines a temperaturas de daño, mostrando un máximo de actividad a los 21 días de conservación ($5,41 \pm 1,61$; $4,74 \pm 2,97$; y $1,81 \pm 1,41$ UE/mg proteína en los frutos control, tratados con 1-MCP y etileno, respectivamente). También en la pulpa, al igual que en la piel, los frutos control conservados a 10°C presentaron un ligero aumento de actividad peroxidasa, aunque en mucha menor medida que los sometidos a bajas temperaturas. De

nuevo los niveles de actividad peroxidasa en piel de calabacín fueron mucho más altos que en la pulpa.

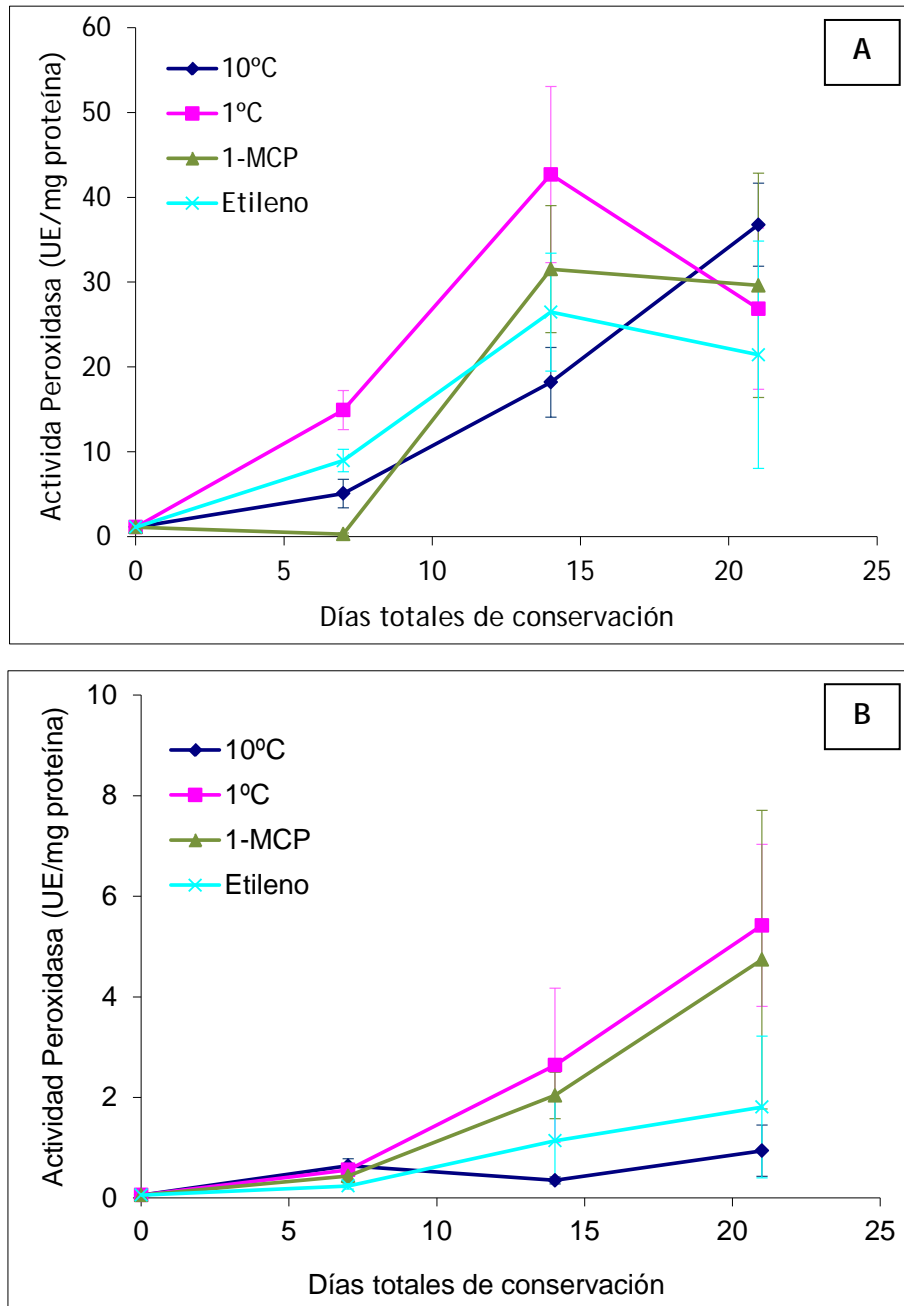


Figura 4.33. Efecto de la conservación de calabacín a 10°C de frutos control y a 1°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 48 h a 20°C sobre la actividad peroxidasa en piel (A) $LSD_{0,05}=9,68$, y en pulpa (B) $LSD_{0,05}=1,50$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de la muestra.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores al estudiar la conservación de calabacín a bajas temperaturas (Gualanduzi *et al.*, 2009; Wang *et al.*,

1995). También se ha visto un aumento de la actividad peroxidasa por bajas temperaturas en otros frutos como mango (Zauberman *et al.*, 1988), pepino (Abeles *et al.*, 1992) y aguacate (Van Lelyveld *et al.*, 1984).

Así pues en los frutos almacenados a bajas temperaturas se produjo un estrés oxidativo, que se vio reflejado en un aumento de la actividad catalasa y peroxidasa en la piel. En este tejido, los frutos almacenados a 10°C presentaron un incremento de la actividad peroxidasa aunque, este incremento fue menos intenso que el de la actividad catalasa.

En chirimoya la actividad peroxidasa fue detectable en piel y pulpa, y al igual que ocurría en calabacín, fue mayor en piel (**Figura 4.34**), estando comprendida entre $0.46 \pm 0,41$ y $1,39 \pm 0,007$ UE/mg proteína en pulpa, frente a $29,48 \pm 7,60$ y $118 \pm 44,86$ UE/mg proteína en la piel.

En la piel de los frutos conservados a 4°C se observó un máximo el día 5 seguido de una disminución drástica (**Figura 4.34A**). Los frutos control a 12°C mostraron un aumento de actividad el día 5, manteniéndose 3 días más, y disminuyendo hasta los niveles iniciales al final de la conservación. Los tratamientos con 1-MCP y etileno mantuvieron la actividad peroxidasa en piel de chirimoya prácticamente constante durante toda la experiencia.

A pesar de las diferencias entre los valores de actividad en la piel de los frutos sometidos a los diferentes tratamientos, en la mayoría de los casos, las diferencias no fueron significativas ($p \leq 0,05$). Es por ello difícil pensar que esta enzima antioxidante juegue un papel importante en los procesos de detoxificación y en el mantenimiento del estado oxidativo celular de la piel de chirimoya, como tampoco lo fue la catalasa en este tejido.

El perfil de la actividad peroxidasa en pulpa de chirimoya (**Figura 4.34B**) fue similar en todos los frutos conservados a baja temperatura, tratados o no, encontrándose una disminución acusada al principio de la conservación para aumentar posteriormente hasta el final de la misma, especialmente en los tratados con 1-MCP y los mantenidos a 4°C. Por el contrario, los controles a 12°C mostraron una disminución gradual desde $1,39 \pm 0,007$ UE/mg proteína el día 0, hasta $0,93 \pm 0,027$ UE/mg proteína el día 12. El aumento de las actividades peroxidasa y catalasa conjuntamente como respuesta a un estrés oxidativo, conlleva una disminución del peróxido de hidrógeno producido y, por tanto un incremento de la tolerancia hacia los daños por frío. Tanto la catalasa como la peroxidasa, que se localizan en distintos orgánulos celulares, eliminan el H₂O₂ generado por el estrés inducido por las bajas temperaturas. Su capacidad antioxidante es dependiente de la severidad del estrés, así como de las especies y de su estado de desarrollo (Willeken *et al.*, 1997).

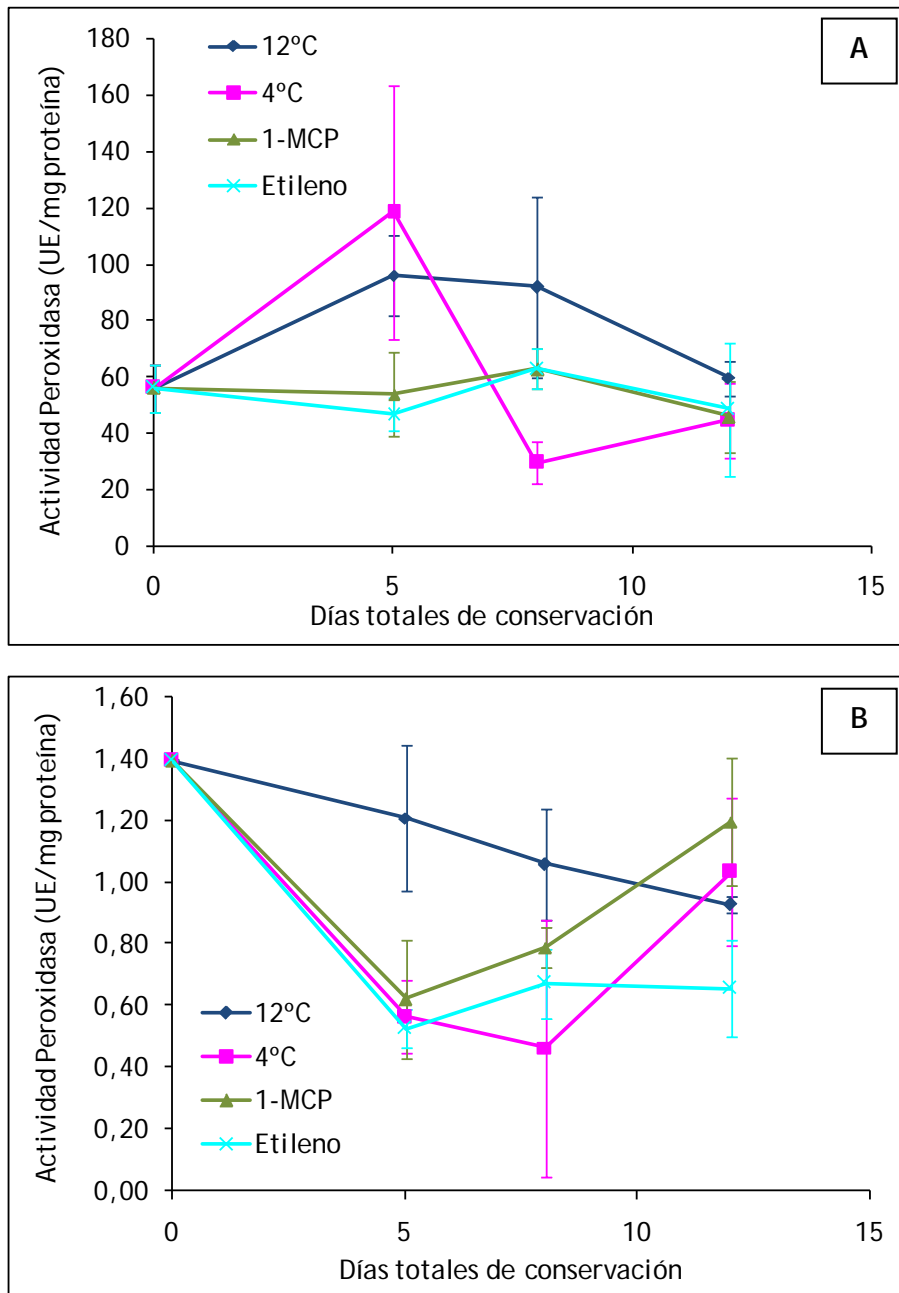


Figura 4.34. Efecto de la conservación de chirimoya a 12°C de frutos control y a 4°C de frutos control y tratados con 1-MCP o etileno tras el reacondicionamiento durante 24 h a 20°C sobre la actividad peroxidasa en la piel (A) $LSD_{0,05}=0,17$, y en la pulpa (B) $LSD_{0,05}=2,25$. Cada dato representa la media \pm SE de las determinaciones hechas en cada uno de los seis frutos de las muestras.

Conclusiones

Síntomas visibles y fisiológicos de daños por frío

1.

La conservación de calabacines y chirimoyas a temperatura de DF retardó la pérdida de peso de los frutos en relación a la temperatura de no daño. La transferencia de los calabacines a 20°C aceleró la deshidratación de los frutos. La pérdida de peso en los frutos de chirimoya fue inferior que en el calabacín, debido a las diferencias en el espesor de la piel y la estructura de la corteza. Los tratamientos con 1-MCP y etileno no afectaron a la deshidratación de calabacín ni de chirimoya.

2.

Los calabacines conservados a 10°C no presentaron síntomas visibles de daños por frío (DF). Los primeros síntomas visibles en los calabacines conservados a 1°C se detectaron a partir de los 12 días siendo incluso superiores los síntomas en los frutos tratados con 1-MCP o etileno. Después de 19 días de conservación a 1°C, todos los frutos, tratados o no, alcanzaron niveles de daño del 90%. El reacondicionamiento a 20°C agravó los DF. Los tratamientos con 1-MCP y etileno, previos a la conservación a 1°C de frutos de calabacín, parecen no tener efecto o incluso agravar los síntomas de DF, más que proteger frente a este factor de estrés.

3.

Las chirimoyas conservadas a 12°C no presentaron síntomas visibles de DF y desarrollaron un patrón de maduración normal. La conservación de chirimoyas a 4°C no provocó manifestaciones visibles de daños por frío ni en la piel ni en la pulpa. Incluso los frutos conservados a 12°C presentaron un pardeamiento más acusado que los conservados a 4°C, debido a los síntomas característicos de la maduración y senescencia de este fruto. El tratamiento con etileno potenció, aunque de forma irregular, el pardeamiento de los frutos, por lo que éste factor no se consideró buen marcador de DF. Es destacable que los frutos conservados a 4°C no presentaron una maduración normal a pesar de haber sido recolectados en su estado óptimo de madurez fisiológica. La evolución durante la conservación a 4°C, de los niveles de sólidos solubles y acidez, confirmaron que los daños por frío en chirimoya se manifiestan en una maduración anómala.

4.

En el caso del calabacín, fruto no climatérico, no se puede afirmar que exista una relación entre la producción de etileno y el desarrollo de DF, ya que el incremento en la producción de etileno que se observó fue similar con todos los tratamientos, siendo incluso más elevada en el control a 10°C, donde no se detectaron daños por frío. Por otro lado, la producción de etileno de chirimoyas, fruto climatérico, conservadas a 12°C presentó el patrón típico para este fruto, con una crisis etilénica muy intensa y en un

intervalo muy corto de tiempo. Cuando las chirimoyas fueron almacenadas a 4°C y tratadas con 1-MCP, se provocó la inhibición de la síntesis etileno. Sin embargo, la evolución durante la conservación de las chirimoyas 4°C, de los sólidos solubles, acidez y pH reflejan una maduración anómala con todos los tratamientos. Por tanto, no parece que el etileno tenga una acción directa sobre el desarrollo de los DF en chirimoya.

5.

Los síntomas de DF en calabacín no se manifestaron en el color de los frutos, ya que no se observaron ni pardeamiento ni amarillamiento de la piel, síntomas característicos del desarrollo de esta fisiopatía. Ni la temperatura de conservación (1°C y 10°C) ni los tratamientos con 1-MCP o etileno, previos a la conservación afectaron al color del calabacín. En chirimoya, la evolución durante la conservación de los parámetros L, a y b confirmaron las diferencias en el patrón de maduración de los frutos entre las dos temperaturas de conservación (4°C y 12°C), ya que una de las características del proceso de maduración normal en chirimoya es el pardeamiento de la piel, que se observó a 12°C, mientras que no se manifestó en los frutos conservados a 4°C.

Estado oxidativo e integridad de las membranas celulares

6.

Las membranas celulares de la piel de los calabacines conservados a 10°C mantuvieron su estructura intacta durante todo el tiempo de conservación presentando valores de salida de electrolitos prácticamente constantes. En cambio, se apreció un aumento significativo de la salida de electrolitos en la piel de todos los frutos a los 21 días a 1°C, independientemente del tratamiento aplicado (control, 1-MCP, etileno), lo que parece indicar, que los tratamientos no tienen efecto sobre la degradación de la estructura de las membranas provocada por la conservación en frío. En pulpa se observó una evolución similar pero menos intensa, por lo que se podría afirmar que la piel es más susceptible a los DF que la pulpa. Las chirimoyas conservadas a 12°C presentaron mayor salida de electrolitos que cuando se almacenaron a 4°C (tratados o no), confirmandose que a 12°C, en chirimoya ocurre la desestructuración de las membranas típico del proceso de maduración que no llega a ocurrir a 4°C.

7.

La peroxidación lipídica aumentó en todos los calabacines sometidos a bajas temperaturas, tanto en piel como en pulpa, aunque fue superior en pulpa. El tratamiento con etileno provocó un considerable incremento de MDA en la pulpa durante la conservación, confirmando que este tratamiento previo a la conservación en frío, más que proteger, agrava los DF. La peroxidación lipídica en la piel de las chirimoyas aumentó de

forma acusada en los frutos conservados a 12°C mientras que, igual que ocurría con la salida de electrolitos, no se observó a 4°C. Sin embargo, mientras que el tratamiento con etileno acelera la peroxidación lipídica en chirimoya, el tratamiento con 1-MCP favorece la estabilización de las membranas celulares.

Sistemas antioxidantes no enzimáticos

8.

El contenido en compuestos fenólicos en la piel de los calabacines se incrementó durante la primera semana de conservación en frío, tanto a 10°C como a 1°C, que coincidiría con la fase de alarma frente al estrés debido al almacenamiento en frío. Los compuestos fenólicos disminuyeron en la piel de los calabacines conservados a 1°C a medida que aumentó el periodo de almacenamiento y, especialmente, si fueron tratados con 1-MCP o etileno. El contenido en compuestos fenólicos en la piel de la chirimoya disminuyó gradualmente en los frutos almacenados a 12°C como consecuencia de la maduración normal. En los frutos conservados a 4°C tratados previamente con etileno, los niveles de polifenoles disminuyeron significativamente tras cinco días de conservación. La pulpa, tanto de calabacín como de chirimoya, mostró menos sensibilidad que la piel a los efectos de las temperaturas y los tratamientos sobre el contenido en fenoles totales.

9.

Los niveles de ácido ascórbico libre en la piel de los calabacines fueron significativamente más altos durante toda la experiencia en los frutos conservados a 10°C que a 1°C. No se apreció ningún efecto significativo de los tratamientos sobre los niveles de ácido ascórbico en la piel. La piel de chirimoya conservada a 4°C presentó un fuerte incremento de ácido ascórbico libre, que podría deberse a una respuesta de defensa frente al estrés oxidativo causado por la maduración anómala. Los tratamientos con 1-MCP y etileno no modificaron los niveles de ácido ascórbico frente al control a 4°C. El contenido en ácido ascórbico libre de la pulpa de calabacín y de chirimoya fue muy superior al contenido de la piel.

10.

Las temperaturas de DF redujeron la capacidad antioxidante de la piel de ambos frutos respecto a la temperatura de no daño. A lo largo de la conservación en la piel de los calabacines conservados a 1°C con o sin tratamiento, se redujo la capacidad antioxidante. En la piel de las chirimoyas conservadas a 4°C se incrementó la capacidad antioxidante, aunque menos que a 12°C.

La temperatura de DF afectó de forma muy diferente a la pulpa, ya que en calabacín se incrementó la capacidad antioxidante con el tiempo de conservación a temperatura de DF y, en chirimoya se mantuvo constante en los niveles iniciales durante el almacenamiento

en frío (4°C), coincidiendo con los resultados de todos los parámetros indicadores de maduración.

Sistemas antioxidantes enzimáticos

11.

Tanto en piel como en pulpa de calabacín se registró una activación de la actividad catalasa como respuesta a las bajas temperaturas, aunque en piel los niveles de esta enzima fueron más elevados. Esta activación se potenció con los tratamientos, 1-MCP y, especialmente, con etileno. El paralelismo que se observa entre el perfil de los daños por frío en piel de calabacín a la salida de cámara de 1°C con el perfil de la actividad catalasa hace pensar que la acción de la catalasa en este tejido apuntaría a una respuesta defensiva de la piel como consecuencia del daño, y no una acción preventiva, dado que la mayor actividad no se correlacionó con menor daño, o mayor tolerancia al frío.

12.

En chirimoya solo se obtuvo actividad catalasa en pulpa, no siendo detectable en piel. A 12°C, el perfil de la actividad catalasa fue paralelo al encontrado para la producción de etileno, reflejando la capacidad celular para reducir el contenido en radicales libres que acompaña a los procesos de envejecimiento y senescencia. Se podría pensar en la posible contribución de esta enzima para rebajar el estrés oxidativo. El hecho de que no se haya registrado actividad catalasa en piel apuntaría a la participación predominante de otras enzimas detoxificantes en este tejido, para prevenir los síntomas de los daños por frío.

13.

En piel de calabacín se observó una activación de la actividad peroxidasa en los frutos almacenados tanto a 10°C como a 1°C, probablemente como consecuencia de un estrés oxidativo provocado por las bajas temperaturas. Los tratamientos con 1-MCP y etileno redujeron ligeramente la actividad peroxidasa en este tejido. De nuevo los niveles de actividad peroxidasa en piel de calabacín fueron mucho más altos que en la pulpa.

14.

A pesar de las diferencias entre los valores de actividad en la piel y en la pulpa de las chirimoyas sometidas a los diferentes tratamientos, en la mayoría de los casos, las diferencias no fueron significativas. Es por ello difícil pensar que esta enzima antioxidante juegue un papel importante en los procesos de detoxificación y en el mantenimiento del estado oxidativo celular de la chirimoya.

Bibliografía

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, Jr. M.K. 1992. Fruit ripening, abscission and postharvest disorders. En: Ethylene in Plant Biology (2ª edición). Publicadopor Academic Press, Londres (UK), pp. 182-221.
- Adams, D.O., Yang, S.F. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of ACC as an intermediary of methionine to ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 170-174.
- Aebi, H., Anderson, M.C., Prasad, T.K., Martin, B.A., Stewart, C.S. 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzimology.
- Ahoroni, Y., Copel, A., Fallik, E. 1993. Storing Galia melon in controlled atmosphere with ethylene absorbent. Hort Science 28: 275-276.
- Alique, R. 1995. Residual effects of short-term treatments with high CO₂ on the ripening of cherimoya (*Annona cherimola Mill*) fruit. Journal of Horticultural Science. 70: 609-615.
- Alique, R., Luna, P., Martinez, M. 2009. Residual effect of atomised water vapour treatment on carbohydrate metabolism during ripening of cv "Fino de Jete" cherimoya fruit. European Food Researche and Technology. 229:661-669.
- Alique, R., Oliveira, G.S. 1994. Changes in sugars and organic-acids in cherimoya (*Annona-Cherimola Mill*) fruit under controlled-atmosphere storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42:799-803.
- Alique, R., Zamorano, J.P., Calvo, M.L., Merodio, C., De la plaza, J.L. 1994. Tolerance of cherimoya to cold storage. J. Amer. Soc. For. Horticultural. Science. 119: 524-528.
- Almela, L., Fernandez, J.A., Roca, M.J. 2000. High performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage. J. Chromatography A. 870:483-489.
- Amako, K., Chen, G.X., Asada, K. 1994. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants". Plant Cell Physiol. 35: 497-504.
- An, J.F., Paull, R.E. 1990. Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit. J. Am. Soc. Hort. Science. 115:949-953.
- Argenta, L., Vieira, M., Tomazini, A. 2009. Quality maintenance of "Fuyu" persimmon in cold storage by combining 1-MCP and modified atmosphere. Revista Brasileira de Fruticultura. 31:323-333.
- Arouma, O.I. 1994. Nutrition and health aspect of free radicals and antioxidant. Food. Chem Toxic. 32:671-682.
- Arouma, O.I. 1996. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. J.A.O.C.S 73: 1617-1625.

- Artés, F. 1995. Innovación en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. II Tratamientos térmicos cíclicos. Rev. Esp. Ciencia. Tecnol. Alim. 35: 139-149.
- Artés, F., 1984. Pretratamientos térmicos y gaseosos en la conservación hortofrutícola. Alim. Equipos Tecnol. 83-86.
- Artés, F., 1995. Innovación en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en posrecolección III Tratamientos gaseosos. Rev. Esp. Ciencia.Tecnol.Alim. 35: 247-269.
- Artés, F., Escriche A., Marin, JG. 1993. Treating Primafiori lemon in cold storage with intermittent warming and carbon dioxide. Hort Science 28: 819-821.
- Artés, F., Escriche, A. 1994. Intermittent warming reduces chilling injury and decay of tomato fruit. J. Food Quality. 29: 1053-1056.
- Artés, F., Tudela, J.A., Villaescusa, R. 2000. Thermal postharvest treatment for improving pomegranate quality and shelf life. Postharv. Biol. Technol 3:245-251.
- Assis, J.S., Maldonado, R., Muñoz, T., Escribano, M.I, Merodio, C. 2001. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. Postharvest Biology and Technology. 23:33-39.
- Autio, W.R., Bramlage, W.J. 1986. Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111:201-204.
- Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. 1996.Expression of ACC oxidase antisense gene inhibit ripening of "Cantaloupe" melon fruit. Nature Biotechnology. 14:826-836.
- Balandran, R.R., Mendoza, M., Gardea, A.A., Vargas, I., Martinez-Tellez, M. 2003. Irreversibility of chilling injury in zucchini squash could be a programmed event long before the visible symptoms are evident. Biochemical and Biophysical Research Communications. 307: 553-557.
- Balandran, R.R., Mendoza, M., Vargas, I., Martinez-Tellez, M. 2007. Activity of beta galactoside and polygalacturonase in zucchini squash stored at low temperature. Food Technology and Biotechnology. 45:396-401.
- Ben Amor, M., Flores, B., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Romojaro, F. 1999. Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA preventchilling injury in *Charentais cantaloupe* melon. Plant.Cell. Environ. 22:1579-1586.
- Ben-Arie, R., Lavee, S., Guelfat-Reich, S. 1970. Control of woolly breakdown of Elberta peaches in cold storage by intermittent exposure to room temperature. J. Am. Soc. Hort. Sci 95: 801-803.

- Ben-Yehoshua, S. 2003. Effects of postharvest heat and UV applications on decay, chilling injury and resistance against pathogens of citrus and other fruits and vegetables. Proceedings of the International Conference Postharvest Unlimited. Pp 159-173.
- Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Chen, Z.E., Lurie, S. 1983. Mode of action of plastic film in extending life of lemon and bell pepper fruits by alleviation of water stress. *Plant. Physiol.* 73:87-93.
- Berger, H., Galletti, L. 2005. Color as a harvest index for cherimoya. Proceeding of the 5th Int Postharvest Symposium. *Acta Horticulturae.* 682: 1471-1474.
- Bertolini, P., Lanza, G., Tonini, G. 1991. Effect of pre-storage CO₂ treatment and storage temperature on membranosis of Femminelocomune lemons. *Sci. Hort.* 46: 89-95.
- Besada, C., Arnal, L., Salvador, A. 2008. Improving storability of persimmon cv. Rojo Brillante by combined use of preharvest and postharvest treatments. *Postharvest Biology and Technology.* 50:169-175.
- Besada, C., Jackman, R., Olsson, S., Woolf, A. 2010. Response of 'Fuyu' persimmons to ethylene exposure before and during storage. *Postharvest Biology and Technology.* 57:124-131.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M. 2003. 1-methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology.* 28:1-25.
- Blanpiel, G.D., 1997. Innovation in prolonging the storage life of apples. XXIth Intern. Hortic. Cong. 2: 248-253.
- Bloch, A., Thomson, C.A. 1995. Position of the American dietetic Association phytochemicals and functional foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 95:439-496.
- Borochoy, A., Wodson, W.R. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hortic. Rev* 11: 15-43.
- Boucherean, A., Aziz, A., Larher, F., Martin, T. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant. Sci.* 140: 103-125.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. 1992. S.O.D and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 43:83-116.
- Bowler, C., Vancamp, N. Inze, D. 1994. S.O.D in plants. Review. *Critical Reviews in Plant Science* 13:199-218.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56:317-333.
- Brennan, T., Frenkel, C. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in Pear. *Plant Physiol.* 59: 411-416.

- Brown, B.I., Wang, L.S., George, A.P., Nissen, R.J. 1988. Comparative studies on the postharvest physiology of fruit from different species of *Annona*. J. Hort. Science. 3:521-528.
- Buescher, R.W. 1977. Hard core in sweet potato roots influences by cultivar curing and ethylene. Hort. Science. 12; 326-328.
- Cabrera, R.M., Saltveit, M.E. 1990. Physiological-response to chilling temperatures of intermittently warmed cucumber fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science. 115:256-261.
- Cadenas, E. 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall NY 1-61.
- Cai, Y., Cao, S., Yang, Z., Zheng, Y. 2011. MeJA regulates enzymes involved in ascorbic acid and glutathione metabolism and improves chilling tolerance in loquat fruit. Postharvest Biology and Technology. 59:324-326.
- Calderón, A., Zapata, J.M., Muñoz, R., Ros, A. 1993. Localization of Peroxidase in Grapes using Nitrocellulose Blotting of Freezing/Thawing Fruits. Hort Science 28:38-40.
- Candan, A.P., Graell, J., Larrigaudiere, C. 2006. Postharvest quality and chilling injury of plums: benefits of 1-methylcyclopropene. Spanish Journal of Agricultural Research. 9:554-564.
- Candan, A.P., Graell, J., Larrigaudiere, C. 2008. Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. Post Biology and Technology. 47: 107-112.
- Candan, A.P., Graell, J., Larrigaudiere, C. 2011. Postharvest quality and chilling injury of plums: benefits of 1-methylcyclopropene. Spanish Journal of Agricultural Research. 9:554-564.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., Tang, S. 2009. Effect of 1-methylcyclopropene treatment on chilling injury, fatty acid and cell wall polysaccharide composition in loquat fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:8439-8443.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., Tang, S. 2010. Effect of methyl jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. Food Chemistry. 118:641-647
- Cao, S.F., Zheng, Y.H., Wang, K.T., Rui, H.J., Shang, H.T., Tang, S.S. 2010. The effects of 1-methylcyclopropene on chilling and cell wall metabolism in loquat fruit. Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 85:147-153.
- Carvajal, F., Martinez, C., Jamilena, M., Garrido, D. 2011. Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. Scientia Horticulturae. 130: 90-96.

- Chaiprasart, P., Gemma, H., Iwahori, S., Drew, R. 2002. Reduction of chilling injury in stored banana fruits by jasmonic acid derivative and abscisic acid treatment. Proceedings of the International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, vols 1 and 2. ActaHorticulturae. Pp 689-696
- Chaplin, G.R., Wills, R.B., Graham, D. 1993. Induction of chilling injury in stored avocados with exogenous ethylene. Hort.Science.18: 952-953.
- Cheftel, J.C., Cheftel, H. 1992. En: Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos (vol. 2). Acribia. Zaragoza.
- Chen, Z.X., Silva, H., Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired-resistance by salicylic-acid. Science.262:1883-1886.
- Christiansen, M.N., Ashworth, E.N. 1978. Prevention of chilling injury to seedling cotton with anti-transpirant. Crop. Sci. 18: 907-908.
- Clifford, M.N. 2000a. Chlorogenic and others cinnamates. Nature, occurrence dietary burden, absorption and metabolism. J. Sci. Food Agric. 80: 1033-1043.
- Clifford, M.N. 2000b. Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric. 80: 1063-1072.
- Côme, D. 1992. Les maladies physiologiques du froid. In les vegetaux et le froid. Ed. Come. Herman Editeurs des Sciences et des Art. Paris p. 53-105.
- Coney, H.M. 1999. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruit. Hort. Science. 24:198-202.
- Conklin, P.L., Last, R.L. 1995. Differential accumulation of antioxidant mRNA in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. Plant. Physiol. 109: 203-212.
- Cooper, W.C., Rasmussen, G.K., Waldon, E.S. 1969. Ethylene evolution stimulated by chilling. Plant Physiol 44:1194-1196.
- Covey, H.M. 1982. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. Hort Science. 17: 162-165.
- Covey, H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pest of fruits. Hort. Sciene. 24:198-202
- Craig, W.J. 1997. Phytochemicals: Guardians of our health. J. Am. Diet. Assoc. 97:199-204.
- Czapski G., Aronwith, J., Chevion, M. 1983. The sensitization of the toxicity of superoxide and vitamin C by copper and iron: a site specific mechanism. En Oxy Radical and their scavenger system. Vol. 1 Cohen G., Greenwald R.A. Eds. Elsevier Biomedical NY. P. 111-115.

- D'Aquino, S., Palma, A., Tedde, M. and Fronteddu, F. 2005. Effect of preharvest and postharvest calcium treatments on chilling injury and decay of cold stored "Fortune" mandarins. *Acta Hort.* 682:631-638.
- Davey, M.W., Montague, M.V., Fletcher, D. 2000. Plant L- ascorbic acid: chemistry, function, metabolism and effect of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80: 825-860.
- Decker, D.S. 1988. Origin, evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (*cucurbitaceae*) *Economic Botany.*42:4-15.
- DeEll, J., Murr, D., Ehsani-Moghaddam, B. 2008. 1-methylcyclopropene treatment modifies postharvest behavior of "Fantasia" nectarines. *Canadian Journal of Plant Science.* 88:753-758.
- Del Cura, B., Escribano, M.I., Zamorano, J.P., Merodio, C. 1996. High carbon dioxide delays postharvest changes in RnBPCase and polygalacturonase related protein in cherimoya peel. *J. Amer. Soc. for Horticultural. Science.* 121:735-739.
- Deutsch, J.C. 1998. Spontaneous hydrolysis and dehydration of the dehydroascorbic acid in aqueous solution. *Anal. Biochem.* 260: 223-229.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant .Sci* 161: 1153-1159.
- Dong, L., Lurie, S., Zhon, H.W. 2002. Effect of 1-MCP on ripening of "Canino" apricots and "Royal Zee" plums. *Post Biology and Technology.*24: 135-145.
- Droillard, M.J., Paulin, A., Massot, J.C. 1987. Free radical production, catalase and SOD activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnation. *Physiol Plant* 71: 197-202.
- Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.I., Thompson, J.E. 1986. Radical scavenging of polyamines. *Phytochemistry.* 25: 367-371.
- Eaks, J. 1980. Effect of chilling injury on respiration and volatiles of California lemon fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 105: 865-869.
- Egea I., 2006. Influencia de diferentes métodos de conservación sobre la calidad y sistemas antioxidantes de alimentos vegetales. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Elstner, E.F. 1987. Metabolism of activated oxygen species. En *The Biochemistry of Plants.* Davis DD ed. Academic. Press. San Diego p. 253-315.
- Escribano, M.F., Del Cura, B., Muñoz, T., Merodio, C. 1997. The effect of high CO₂ at low temperature on ribulose 1-5 biphosphate carboxylase and polygalacturonase protein levels in cherimoya fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122: 258-262.

- Escribano, M.I., Aguado, P., Reguera, R.M., Merodio, C. 1996. Conjugated polyamine levels and putrescine synthesis in cherimoya fruit during storage at different temperatures. *J Plant Physiology*. 147: 736-742.
- Escribano, M.I., Merodio, C. 1993. Modifications in polyamine levels of cherimoya fruit during the initial state of storage at chilling temperature. *Acta Horticulturae*. 343: 279-280.
- Escribano, M.I., Merodio, C. 1994. The relevance of polyamine levels in cherimoya fruit ripening. *J Plant Physiology* 143:207-212.
- Escribano, M.I., Molina-Garcia, A.D., Merodio, C. 2003. High carbon dioxide pre-treatment activates the defense mechanism and avoid responses induced by chilling temperatures storage in cherimoya fruit. *Acta Horticulturae*. 600: 361-367.
- Fallik, E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharv. Biol. Technol*. 32:125-134
- Fernandez Trujillo, J.P., Artes, F. 1998. Chilling injures in peach during conventional Intermittent warming storage. *Int J Refrig* 21:265-272.
- Fernández-Trujillo, J.P., Artes, F. 1997. Keeping quality of cold stored peaches using intermittent warming. *Food. Res. Int.* 30: 441-450.
- Fernández-Trujillo, J.P., Artes, F. 2003. Ethylene production in peaches subjected to intermittent warming cycles as related to chilling injury. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*.349:439-440.
- Fernández-Trujillo, J.P., Cano, A., Artés, F. 1998. Physiological changes in peaches related to chilling injury and ripening. *Postharv. Biol. Technol* 13: 109-119.
- Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Artés, F. 1998. Modified atmosphere packaging affects the incidence of cold storage disorders and keeps flat peach quality. *Food. Res. Int.* 31:571-579.
- Ferradini, C. 1986. Especies reactivas radical aires ´oxygene. *Biochimie* 68: 779-785.
- Ferri, C., Rombaldi, C., Silva, J., Pegoraro, C., Nora, L., Tibola, C. 2008. Boron and calcium sprayed on "Fuyu" persimmon tree prevent skin cracks, groove and browning of fruit during cold storage. *Ciencia Rural*. 38:2146-2150.
- Field, R.J. 1981. The role of low temperature and ethylene production by leaf tissues of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.* 47:215-219.
- Field, R.J. 1990. Influence of chilling stress on ethylene production. En Ed. Wang CY. *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press. Boca Raton.
- Fielding, J.L., Hall, J.L. 1973. A biochemical and cytochemical study ef peroxidase activity in roots of *Pisumsativum*. *J. Exp. Bot.*, 29: 969-981.

- Flores, B., Martínez-Madrid, M.C., Ben Amor, M., Pech, J.C., Latche, A., Romojaro, F. 2004. Modified atmosphere packaging confers additional chilling tolerance on ethylene inhibited cantaloupe "Charentais" melon fruit.
- Flores, H.E. 1990. Polyamines and plant stress. En Stress response in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Ed. Alscher R.G and Cumming J.R. Wiley-Liss N.Y. p. 217-239.
- Florissen, P., Ekman, J.S., Blumenthal, C., Mc Glasson, WB., Conroy, J. 1996. The effects of short heat treatments on the induction of chilling injury in avocado fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 8: 129-141.
- Fonseca, J.M., Cinco, R.A. 2006. Evaluation of commercial alternatives to reduce postharvest pitting of organically grown zucchini and cucumber. *Acta Horticulturae* 712: 291-297.
- Fouque, A., 1972. *Especies frutieras d´Amerique tropical.* Fruit 27:62-72.
- Frenkel, C. 1972. Involvement of peroxidase and indole-3 acetic acid oxidase isoenzymes from pear, tomato and blueberry fruit in ripening. *Plant Phisiol.* 49:757, 763.
- Fridovich, I. 1983. Superoxide radical. An endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharm.* 23: 238-257.
- Fries, R.E. 1959. A new xylophia from Suriname (Annonaceae). *Acta Botanica Neerlandica.* 1:243-243.
- Fuster C., Prestamo G. 1980. Variation of cherimoya texture during storage, as determined with an Instron food testing instrument. *J Food Science* 45:142-145.
- Gajewski, M. 2003. Sensory and physical changes during storage of zucchini squash. *Acta Horticulturae.* 604: 613-617.
- Gal, S., Alkalai-Tuvia, S., Elkind, Y., Fallik, E. 2006. Influence of different concentrations of 1-methylcyclopropene and times of exposure on the quality of "Galia" type melon harvested at different stages of maturity. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* 81:975-982.
- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R. 1987. Polyamines and senescence in plant. En *Plant Senescence: Its biochemistry and physiology.* Ed. Thompson WN. Amer. Soc. Plant. Phisiol. p. 167-181.
- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant. Phisiol.* 94: 406-410.
- García-Alonso, T. 2002. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en un producto elaborado con frutos rojos. Tesis licenciatura. Universidad de Murcia.

- Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M., Woolf, A. 2008. Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in "Satsuma" mandarins: antioxidant enzymes and vacuolar ATPase and pyrophosphate. *Postharv. Biol. Technol* 48: 364-371.
- Given, N. K. 1988. Changes in enzyme activities related to colour development in ripening strawberries. *Dissertation Abstracts International*.49:213pp.
- Given, N.K., Venis, M.A., Grierson, D. 1988. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non climacteric fruit. *Planta* 17: 402-406.
- González, G.A., Goyossol, L., Cruz, R., Fortis, J., Wang, C.Y. 2000. Polyamines induced by hot water treatments reduce chilling injury and decay in pepper fruit. *Postharv. Biol. Technol* 18:19-26.
- González-Aguilar, G., Wang, C.Y., Buta, G.J. 2004. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:415-422.
- González-Aguilar, G.A., Zavaleta-Gatica, R., Tiznado-Hernandez, M. E. 2007. Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 45:108-116
- Gosalbes, M.J., Zacarias, L., Lafuente, M.T. 2004. Characterization of the expression of oxygenase involved in chilling induced damage in citrus fruit. *Postharv. Biol. Technol*. 32: 219-228.
- Gosset, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop. Sci*. 34:706-714
- Grierson, D. 1974. Senescence in fruit. *Hort Science*. 22:859-862.
- Gualanduzzi, S., Baraldi, E., Braschi, I., Gessa, C., De Santis, A. 2009. Respiration, hydrogen peroxide levels and antioxidant enzyme activities during cold storage of zucchini squash fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 52: 16-23.
- Gusev, N.B., Botatchera, N.V., Marston, S.B. 2002. Structure and properties of small heat shock protein and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry* 67: 511-519.
- Gutierrez, M., Lahoz, J.M., Sola, M.M., Pascual, L., Vargas, A.M. 1994. Postharvest changes in total soluble solids and tissue pH of cherimoya fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Journal of Horticultural Science*. VL 69:459-463.
- Gutierrez, M., Pascual, L., Sala, M.M., Rodriguez, M.I., Vargas A. 1992. Studies of cherimoya fruits during ripening. *Electron Microscopy 3.Eurem* 92.
- Gutierrez, M., Sola, M.D., Pascual, L., Vargas, A.M. 1994. Postharvest changes of sugar concentration in chilled injured cherimoya. *J Plant Physiology* 143: 27-32.

- Gutierrez, M., Sola, M.M., Pascual, L., Rodriguez, M.I., Vargas A.M. 1992. Ultrastructural changes in cherimoya fruit injured by chilling. *Food Structure*. 11: 323-332.
- Gutierrez, M., Sola, M.M., Vargas, A.M. 2005. Fatty acid composition of phospholipids in mesocarp of cherimoya fruit during ripening. *Food Chemistry*. 90:341-346.
- Guye, M.G., Vigh, L., Wilson, J.M., 1986. Polyamines titre in relation to chilling sensitivity in *Phaseolus*. *J. Exp. Bot.* 37:1036-1043.
- Hakim, A. 1997. Approaches to reduce chilling injury of tomato fruit. Doctoral Thesis, Department of Plant Production Horticulture Section, University of Helsinki.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. Oxford.
- Halliwell, B. 1996. Vitamin C: antioxidant or prooxidant in vivo. *Free Radical Res.* 25: 439-454.
- Halliwell, B. 1996. Cellular stress and protective mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 1023-1027.
- Halliwell, B. 1996. Mechanisms of ageing and development. *Ann. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O. 1995. Free radicals and antioxidants in foods and in vivo: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food. Sci.* 35:7-20
- Handerburg, R.E., Watada, A.E., Wang, C.Y. 1986. The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stock. U.S. Dept. Agr. Hanbk.66.Wash DC.
- Hariyadi, P. y Parkin, K.L 1991. Chilling-induced oxidative stress in cucumber fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 1: 33-45.
- Hermoso, G.J., Perez, M.A., Ruiz, A., Farre, J.M. 1999. The spanish germoplasm bank of cherimoya (*Annona cherimola Mill*). *Acta Horticulturae*. 497: 201-212.
- Hewajulige, I.G.N., Wijeratnam, R.S.W., Wijesundera, R.L.C., Abeysekere, M. 2003. Fruit calcium concentration and chilling injury during low temperature storage of pineapple. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83:1451-1454.
- Hewajulige, I.G.N., Wijeratnam, S.W., Wijesundera, R.L.C. 2006. Pre-harvest application of calcium to control black heart disorder in Mauritius pineapples during low-temperature storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86:420-424.
- Hideg, E., Mano, J., Ohno, C., Asada, K. 1997. Increased levels of monodehydroascorbate radical in UV-B irradiated broad bean leaves. *Plant. Cell. Physiol.* 38:684- 690
- Hiriyadi, P., Parkin, K.L. 1991. Chilling induced stress in cucumber fruit. *Postharvest Biol and Technology* 1:33-45.

- Hodges, D.M., Lester, G., Munro, K., Toivonen, P. 2004. Oxidative stress: Importance for postharvest quality. *Hort Science* 39: 924-929.
- Holland, N., Menezes, H.C., Lafuente, M.T. 2002. Carbohydrates as related to the heat-induced chilling tolerance and respiratory rate of Fortuna mandarin fruit harvested at different maturity stages. *Postharv. Biol. Technol.* 25: 181-191.
- Idstein, H., Herves, W., Schreier, P. 1984. High resolution gas chromatography-mass spectrometry and Fourier transform infrared analysis of cherimoya volatiles. *J. Agric. Food. Chem.* 32:383-389.
- Ilker, R., Waring, A.J., Lyons, J.M., Breidenbach, R.W. 1976. Cytological responses of tomato-seedling cotyledons to chilling and influence of membrane modifications upon these responses. *Protoplasma*.90:229-252
- Izumi, H., Watada, A.E., Douglas, W. 1996. Low O₂ atmospheres affect storage quality of zucchini squash slices treated with calcium. *J of Food Science.* 61: 317-321.
- Jain, K.; Sunita, K; Guruprasad, K.N. 2003. Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UV-B and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Science.* 165: 551-557.
- Javanmardia, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food. Chem.* 83: 547-550.
- Ju, Z., Yuan, Y., Liou, C., Xiu, S. 1994. Effect of low temperature on H₂O₂ and heart browning of chili and Yali pear. *Scientia Agricultural Sinica* 27:77-81.
- Kacperska, A. 1989. Metabolic consequences of low temperature stress physiology in crops. Ed. Paul HJ. CRC. Press. Florida. p. 28-41.
- Kader, A.A. 1990. Modified atmospheres during transport and storage of fresh fruits and vegetables. I. *Int. Cong. Food. Technol. Development. Murcia* 1: 149-163.
- Kader, A.A. 2002. *Postharvest Biology and Technology: An Overview.* Cap. 4. *Postharvest Technology of Horticultural Crops.* Ed. A. Kader University of California p. 39-47.
- Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E.L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 38: 1-30.
- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R.L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 4638-4644.
- Kasamo, K., Yamaguchi, M., Nakamura, Y. 2000. Mechanism of the chilling-induced decrease in proton pumping across the tonoplast of rice cells. *Plant and Cell Physiology*.41:840-849.

- Kim, T.E., Kim, S.K., Han T.J., Lee, J.S., Chang, S.C. 2002. ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold stressed tomato. *Physiol. Plant.* 115:370-376.
- King, MM., Ludford, PM. 1983. Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of different tomato cultivars. *J Amer Soc Hort Science.* 108: 74-77.
- Kluge, R., Jomor, M., Edag, F., Jacomin, A., Del Aguila, J. 2007. Chilling injury and quality of citric fruits submitted to thermal treatments and cold storage. *Revista Brasileira de Fruticultura.* 29:233-238.
- Kluge, R.A., Jomori, M.L.L., Jacomino, A.P., Vitti, M.C.D., Padula, M. 2003. Intermittent warming in Tahiti lime treated with an ethylene inhibitor. *Postharv. Biol. Technol* 29:195-203.
- Kosiyachinda, S., Yand, R.E. 1976. Chilling sensitivity of avocado fruits at different stage of the respiratory climacteric. *J. Amer. Soc. Hort.* 101:665-667.
- Kramer, G.F., Wang, C.Y. 1989. Correlation of reduced chilling injury with increased spermidine and spermine levels in zucchini squash. *Physiol. Plant* 76:479-484.
- Kramer, G.F., Wang, C.Y. 1990. Effects of chilling injury and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini. *J. Plan. Physiol.* 115-119.
- Kratsh, H.A., Wise, R.R. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ.* 23:337-350.
- Kumer, A., Altabella, T., Taylor, M.A., Tiburcio, A.F. 1997. Recent advances in polyamines research. *Trends.Plant. Sci.* 2:124-130.
- Kunimoto, M., Inoue, K., Nojima, S. 1981. Effect of ferrous ion and ascorbate induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 646:169-178.
- Lacan D., Baccou J.C. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. *Planta* 204: 377-382.
- Lacan, D., Baccou, J.C. 1996. Changes in lipids and electrolyte leakage during nonnetted muskmelon ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Science.* 121: 554-558.
- Lafuente, M.T., Martinez, M.A., Zacarias, L. 1997. ABA in the response of "Fortune" mandarin to chilling. Effects of maturity and high temperature conditioning. *J. Sci. Food. Agric* 73: 494-502.
- Lafuente, M.T., Zacarias, L., Martinez-Tellez, M.A., Sanchez-Ballesta, M.T., Dupille, E. 2001. Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49:6020-6025.
- Lan, O.L. 1989. Storage of Spartan and Delicious apples in a low-ethylene, 1,5% O₂ plus 1,5% CO₂ atmosphere. *Hort. Science* 24:278-280

- Laoz, J.M., Gutierrez, M., Sola, M.M., Vargas A. 1993. Ethylene in cherimoya fruit (*Annona cherimola Mill.*) under different storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 41:721-723.
- Larrigaudiere, C., Paula, Ana., Ubach, D., Graell, J. 2009. Physiological response of "Larry Ann" plums to cold storage and 1-MCP treatment. *Postharvest Biology and Technology.* 51:56-61.
- Larson, R.A. 1995. Antioxidant mechanisms of secondary natural products. En *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.* Chapman and Hall NY.210-237.
- Lee, B.H., Won, S.H., Lee, H.S., Miyao, M., Chung, W.J., Kim, I.J. 2000. Expression of the chloroplast localized small heat shock proteins by oxidative stress in rice. *Gene* 245: 283-290.
- Lee, S.K., Young, R.E. 1984. Temperature sensitivity of avocado fruit in relation to ethylene treatment. *J. Amer. Soc. Hort.* 109: 689-692.
- Lee, T.M. 1997. Polyamines regulation of growth and chilling tolerance of rice root cultured in vitro. *Plant. Sci* 122:111-117.
- Lelièvre, J.M., Tichit, L., Filloin, L., Latche, A., Pech JC. 1997. Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in "Pass-Crassane" pear fruit. *Plant. Mol. Biol.* 33:847-855.
- Leshem, Y.Y., Pinchasov, Y. 2002. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content during the ripening of strawberries and avocados. *J. Exp. Botany* 51: 1471-1473.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H., Ku, V. 1998. Evidence for the function of the free radical gas NO as an endogenous regulating factors in higher plant. *Plant. Physiol. Biochem.* 36: 825-833.
- Leshman, Y.Y., Kuiper, PJ. 1966. Is there GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress?. *Biol. Plant.* 38: 1-8.
- Lester, G., Stein, E. 1993. Plasma membrane physicochemical changes during maturation and postharvest storage of muskmelon fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Science.* 118:223-227.
- Li, C., Wei, L., Wan-Jin, J., Chen, J. 2009. 1-MCP delayed softening and affected expression of XET and EXP genes in harvested cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 52:254-259.
- Li, L., Van Staden, J., Jager, A.K. 1998. Effects of plant growth regulator on the antioxidant system in seedling of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant. Growth. Reg.* 25: 81-87.

- Lim, C., Kang, S., Cho, J., Gross, K. 2009. Antioxidizing enzyme activities in chilling-sensitive and chilling-tolerant pepper fruit as affected by stage of ripeness and storage temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134:156-163.
- Lipton, W.J. 1978. Chilling injury of "Honey Dew" muskmelons. Symptom and relation to degree of ripeness at harvest. *Hort. Science*. 13:45-46.
- Lipton, W.J., Aharoni, Y. 1979. Chilling injury and ripening of "Honey Dew" muskmelon stored at 2,5°C or 5°C after ethylene treatment at 20°C. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 327-330.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, X.H., Sun, D.Q., Mo, Y.W., Xi, J.G., Sun, G.M. 2010. Effects of post-harvest salicylic acid treatment on fruit quality and anti-oxidant metabolism in pineapple during cold storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 85:454-458.
- Lu, X.H., Sun, D.Q., Li, Y., Shi, W., Sun, G.M. 2011. Pre and post-harvest salicylic acid treatments alleviate internal browning and maintain quality of winter pineapple fruit. *Scientia Horticulturae*. 130:97-101.
- Luo, Z., Chen, C., Xie, J. 2011. Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 62:115-120.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatment. *Postharv. Biol. Technol* 14: 257-269.
- Lurie, S., Klein, J.D. 1991. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116: 1007-1012.
- Lurie, S., Pesis, E. 1992. Effect of acetaldehyde and anaerobiosis as postharvest treatments on the quality of peaches and nectarines. *Postharv. Biol. Technol.* 1: 317-326.
- Lurie, S., Sabehat, A. 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. *Postharv. Biol. Technol.* 11:57-62.
- Lutz, J.M., Hardenburg, R.E. 1968. The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks. USA. Dept Agriculture. *Agriculture Handbook* n°66.
- Lyons JM., Raison JK. 1970. Oxidative activity of mitochondria isolate from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol* 45: 386-389.
- Lyons, J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 445-466.
- Lysiak, J.J., Nguyen, Q.A., Turner, T.T. 2002. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J. Androl.* 23: 400-409.

- Maldonado, R., Molina-García, A.D., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2002. High CO₂ atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimoya* fruit stored at chilling temperature. *J Agriculture and Food Chemistry*. 50: 7564-7568.
- Mao, L., Wang, G., Zhu, C., Pang, H. 2007. Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling injury in postharvest cucumber fruits. *Plant Sci* 172:400-405
- Marangoni, A.G., Palma, T., Stanley, D.W. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*. 7: 193-217.
- Marcellin, P., Ulrich, R., 1983. Comportement des fruits et légumes en conditions modulées et programées. *Int .J. Refrigeration* 6:329-336.
- Markhart, A.H., 1986. Chilling injury: a review of possible causes. *Hort. Sci.* 21:1329-1333.
- Martinez, G., Serrano, M., Pretel, M.T., Riquelme, F., Romojaro, F. 1993. Ethylene biosynthesis and physico-chemical changes during ripening of cherimoya. *J Horticultural Science*. 68: 477-483.
- Martinez-Madrid, M.C., Flores, F., Romojaro, F. 2002. Behaviour of ABA and polyamines in antisense ACC oxidase melon during ripening. *Fun. Plant. Biol.* 29: 865-872.
- Martínez-Téllez, M.A. y Lafuente, M.T. 1997. Temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled "Fortune" mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150: 674-678.
- Martinez-Tellez, M.A., Ramos-Clamont, M.G., Gardea, A.A., Vargas-Arispuro, I. 2002. Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo L.*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*.295:98-101.
- Mattoo, A.K., Lieberman, M. 1977. Localization of ethylene-synthesizing system in apple tissue. *Plant Physiology*. 60:794-799.
- Mc Donald, R.E., McCollum, T.G., Baldwin, E.A. 1999. Temperature of water heat treatments influences tomato fruit quality following low temperate storage. *Postharv. Biol. Technol.* 16:147-155.
- McCollum, T.G. 1989. Physiological changes in yellow summer squash at chilling and no chilling temperatures. *Hort Science*. 24:633-634.
- McCollum, T.G., D´Aquino, S., McDonald, R.E. 1993. Heat treatment inhibits mango chilling injury. *Hort Science* 28:197-198.
- McDonald, R.E., Kushad, M.M. 1986. Accumulation of putrescine during injury of fruits. *Plant Physiol.* 82:324-326.

- McMurdo, A.C., Wilson, J.M. 1980. Chilling injury and Arrhenius plots. *CryoLett* 1: 231-238.
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Muñoz Blanco J., Caballero, J.L. 1998. Cloning and molecular characterization of strawberry fruit ripening related cDNA corresponding a mRNA for a low molecular weight heat shock protein. *Plant. Mol. Biol.* 36:33-42.
- Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Bays, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant diseases resistance. *Plant Physiol* 98: 365-374.
- Meir, S., Akerman, M., Fuchs, Y., Zauberman, G. 1995. Further studies on the controlled atmosphere storage of avocados. *Postharv. Biolo. Technol.* 5: 323-330.
- Meir, S., Naiman, D., Akerman, M., Hyman, J.Y., Zauberman, G., Fuchs, Y. 1997. Prolonged storage of Hass avocado fruit using modified atmosphere packaging. *Postharv. Biolo. Technol.* 12:51-60.
- Mencarelli, F. 1987. Effect of high CO₂ atmosphere on stored zucchini squash. *J Am Soc Hort Sci.* 112:985-988.
- Mencarelli, F., Lipton, W.J., Peterson, J.J. 1983. Response of zucchini squash to storage in low O₂ atmosphere at chilling and no-chilling temperatures. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 108:884-890.
- Miccolis, V. 1990. Aspetti Fisiologici e tecnologici della pre refrigerazione degli ortaggi *IIFredo* 44: 95-102.
- Miesle, T.J.; Proctor, A.; Lagrimini, L.M. 1991. Peroxidase activity, isoenzymes and tissue localization in developing highbush blueberry fruit. *J.Amer.Soc.Hort. Sci.* 116:827, 830.
- Miller, A.R. 1989. Mechanical stress induced changes in sugar composition on cell walls from cucumber fruit tissues. *Phytochemistry.* 28: 389-392.
- Mirdehgan, S.H., Rahemi, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M. 2007. Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: Role of polyamines. *Postharv. Biol. Technol.* 44:19-25
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Montero, L.M., Escribano, M.I., DelaPlaza, J.L., Merodio, C. 1995. Chilling temperature storage induces changes in protein-patterns and protease activity in cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 6:367-375.
- Montero, L.M., Zamorano, J.P., Plaza, J.L., Merodio, C. 1993. Modification of specific ripening proteins by low temperature storage of cherimoya. *Acta Horticulturae.* 343: 277-278.

- Muñoz, M.T., Aguado, P., Ortega, N., Escribano, M.I., Merodio, C. 1999. Regulation of ethylene and polyamine synthesis by elevated carbon dioxide in cherimoya fruit stored at ripening and chilling temperature. *Australian J of Plant Physiology* 26:201-209.
- Muñoz, T., Sanchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C. 2004. The acid metabolism of *Annona* fruit during ripening. *J Horticultural Science and Biotechnology*.79:472-478.
- Namesny, A. Post-recolección de hortalizas. Vol III, Hortalizas de fruto. Reus: Ediciones de Horticultura S.L., 1999.
- Nguyen, T.B.T., Ketsa, S., Doorn, W.G. 2004. Effect of modified atmosphere packaging on chilling induced peel browning in banana. *Postharv. Biolog. Technol.* 31: 313-317.
- Nguyen, X.V., Mazliak, P. 1990. Chilling injury induction is accompanied by galactolipid degradation in tomato pericarp. *Plant. Physiol. Biochem.* 28: 283-291.
- Nomura, K., Terai, H., Yabe, K., Maeda, M., Yonemoto, J.Y. 1997. Comparison of changes in sugar and ethylene production of cherimoya fruit grown at different season. *J of Horticultural Science.* 72:617-622.
- Nover, L. 1991. Heat shock proteins response. Boca Raton FL.CRC.Press.
- O'Hare, T.J., Prasad, A. 1993. The effect of temperature and carbon dioxide on chilling symptoms in mango. *Acta Hort* 342:244-250.
- Ochse, J.J., Soule, M., Dijkman, M.J. 1974. Otros cultivos frutales. En *Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales*. Ed. Limusa, Mejico. Pp.587-818.
- Paliyath, G., Droillard, M.J. 1992 The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 34: 789-812.
- Palma, T., Aguilera, J.M., Stanley, D.W. 1993. A review of postharvest events in cherimoya. *Postharvest Biology and Technology* 2: 187-208.
- Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Methods. Enzymal* 213: 403-420.
- Paris, H.S. 1989. Historical records, origins and development of edible cultivar groups of *Cucurbita pepo*. *Economic Botany.* 43:423-443.
- Paris, H.S. 2001. Hystory of the cultivar group of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews.* 25:71-170.
- Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Katzir N. 2003. Assessment of genetic relationship in *Cucurbita pepo* using DNA markers. *Theor. Appl.Genet.* 106: 971-978.
- Parkin, K.L., Kuo, S.J. 1989. Chilling induced lipid degradation in cucumber fruit. *Plant Physiol.* 90:1049-1059.

- Parsell, D.A., Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annual Review of Genetics* 27: 437-496.
- Pascual, L., Perfectti, F., Gutierrez, M., Vargas, A.M. 1993. Characterizing isozymes of spanish cherimoya cultivars. *Hort. Science* 28:845-847.
- Paull, R.E., Chen, N.J. 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharv. Biol. Technol.* 21:21-37.
- Peng, J., Haitao, S., Jingjing, C., Hong, Z., Yingying, Z., Yonghua, Z. 2011. Effect of 1-methylcyclopropene on chilling injury and quality of peach fruit during cold storage. *Journal of Food Science.* 76:485-491.
- Peng, J., Yonghua, Z., Shuangshuang, T., Huaijin, R., Wang, C.Y. 2009. Combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 52:24-29.
- Perez-Tello, G.O., Silva-Espinoza, B.A., Martinez-Tellez, M.A. 2001. Effect of temperature on enzymatic and physiological factors related to chilling injury in carambola fruit (*Averrhoa carambola L.*). *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 287:846-851
- Perfectti, F. 1995. Estudio de marcadores genéticos en chirimoyo, con aplicación a la identificación varietal. Evolución de los recursos genéticos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Pesis, E., Ackerman M., Ben-Arie R., Prusky, D. 2002. Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biol and Tchnology* 24:171-181.
- Pesis, E., Aharoni, D., Aaron, Z., Ben-Arie, R. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 19:93-101.
- Plata M.C., Demedina, L.S., Martinez-Cayuela, M., Faus, M.J., Gil, A. 1987. Changes in texture, protein content and polyphenoloxidase and peroxidase activities in cherimoya induced by ripening in hypobaric atmospheres or in presence of sulfite. *Revista de Agroquímica y Tecnología de alimentos.* 27: 215-224.
- Plaza, J.L., Muñoz-Delgado, L., Iglesias, C. 1979. Controlled atmosphere storage of cherimoya. *Bulletin de l'Institut International du froid* 59:1154-1155.
- Plumb, G.W., Chambers, S.J., Arouma, O.J. 1996. Antioxidant actions of fruit, herbs and spice extracts. *J. Food Lipids* 3: 171-178.
- Polenta, G.A., Calvete, J.J., González, C.B. 2007. Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment. *FEBS J.* 274:6447-6455.

- Pongprasert, N., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H. 2011. A novel postharvest UV-C treatment to reduce chilling injury (membrane damage, browning and chlorophyll degradation) in banana peel. *Scientia Horticulturae*. 130:73-77.
- Poovala, V.S., Huang, H., Salahudeen, A.K. 1999. Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate bidrin induced renal tubular cytotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1746-1752.
- Popenoe, W. 1974. The Annonaceous fruits. The chirimoya. In *Manual of tropical and subtropical fruits*. Fascimil of the 1920.Ed. Hafner.Press. NY. Chapter. 5: 161-189.
- Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben-Yehoshua, S., Lurie, S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of "Star Ruby" grape fruit. *Postharv. Biol. Technol* 18:159-165.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Dans, A., Goren, R., Droby S.1999. Effects of ethylene and 1-MCP on the postharvest qualities of "Shamouti" oranges. *Postharvest Biol and Tchnology* 15: 155-163.
- Prabath, U.A., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H. 2011. Effect of combined application of 1-MCP and low oxygen treatments on alleviation of chilling injury and lipid oxidation stability of avocado (*Persea americana Mill.*) under low temperature storage. *Fruits*. 66:161-170
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. 1994. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role for hidrogene peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Pretel, M.T., Serrano, M., Amoros, A., Riquelme, F., Romojaro, F. 1995. Non involvement of ACC oxidase activity in pepper fruit ripening. *Postharv.Biol.Technol.* 5:529-302.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J. 1994. Oxidative signal in tobacco increase with cytosolic calcium. *Plant Cell* 6: 1301-1310.
- Puppo, A., Halliwell, B. 1988a. Formation of hydroxyl radicals in biological systems. *Free. Rad. Res. Comm.* 4: 415-422.
- Puppo, A., Halliwell, B. 1988b. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in presence of iron. Is hemoglobin a biological Fenton reagent. *Biochem* 249: 185-190.
- Quaglia, B., Paoletti, F., Beye, C., Raffo, A. 1998. Antioxidant role of minor compounds in vegetables with particular attention to oils. *Recent Res Devel en Nutrition Res.* 2: 91-111.
- Quesada, M.A., Sánchez Roldán, C., Heredia, A., Valpuesta, V., Bukovak, M.J. 1992. Peroxidase and IAA activities and peroxidase isoenzymes in the pericarp of seeded and seedless "Redhaven" peach fruit. *J. Plant. Growth.Regul.* 11: 1-6.
- Raison, J.K. 1980. Effect of low temperature on respiration. In *The biochemistry of plants: a comprehensive treat rise*. Ed. Davis DD. Academic Press N.Y. p.613-626.

- Raison, J.K., Orr G.R. 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. Chilling injury of horticultural crops. Ed Wang CY. CRC. Press. Boca. Raton p. 145-164.
- Ramezani, A., Rahemi, M., Maftoun, M., Safizadeh, M., Tavallali, V. 2010. The ameliorative effects of spermidine and calcium chloride on chilling injury in pomegranate fruits after long-term storage. *Fruits*. 65:169-178.
- Reitter, R.J. 1995. Oxidative process and antioxidative mechanism. *FASEB J* 9:526-535.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. 1997. Measurement of antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma. *Leukot. Essent. Fatty. Acids*. 57:499-505.
- Rikin, A., Blumenfeld, A., Richmond, A.E. 1976. Chilling resistance as affected by stressing environment and ABA. *Bot. Gaz* 137: 307-312.
- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 18:571-573.
- Robards, K., Prenzel, P.D., Tucker, G., Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruit. *Food. Chem.* 66:401-436.
- Robert, Heath., L, Packer 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 125:189-198.
- Rozenzweig, D., Elmac, C., Samach, A., Lurie, S., Porat, R. 2004. Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Plant Physiol* 121: 421-428.
- Ruelland, E., Vaultier, Marie., Zachowski, A., Hurry, V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*. 49: 135-150
- Sabban-Amin, R., Feygenberg, O., Belausov, E., Pesis, E. 2011. Low oxygen and 1-MCP pretreatments delay superficial scald development by reducing reactive oxygen species (ROS) accumulation in stored "Granny Smith" apples. *Postharvest Biology and Technology*. 62:295-304.
- Sabehat, A., Lurie, S., Weiss, D. 1998. Expression of small heat shock proteins at low temperatures. *Plant Physiol* 117: 651-658.
- Sala, J.M. 1998. Involvement of oxydative stress in chilling injury in cold stored mandarine fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 13:255-261.
- Sala, J.M., Lafuente, M.T. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarine fruit to chilling injury. *Postharv. Biol. Technol.* 20:81-89.

- Saltveit, M.E. 2003. Physiological response to chilling temperatures of intermittently warmed cucumber fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 256-261.
- Salvador, A., Arnal, L., Monterde, A., Cuquerella, J. 2004. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv "Rojobrillante" by 1-MCP. *Postharv. Biol. Technol.* 33:282-291.
- Salvador, A., Carvalho, CP., Monterde, A., Martinez-Javega, J.M. 2006. 1-MCP effect on chilling injury development in "Nova" and "Ortanique" mandarins. *Food Science and Technology International.* 12:165-170.
- Sanchez de Medina, L., Plata, M.C., Martinez-Cayuela, M., Faus, M.J., Gil, A. 1987. Changes in polyphenoloxidase, peroxidase, catalase and acid phosphatase activities for cherimoya fruit during ripening in controlled temperature and relative humidity. *Revista de Agroquímica y Tecnología de alimentos* 26:529-538.
- Sanchez, J.A., Zamorano, J.P., Hernandez, T., Alique, R. 1998. Enzymatic activities related to cherimoya fruit softening and sugar metabolism during short term controlled atmosphere treatment. *Z.fur. Lebensmittel. Food. Research.Technology.* 207: 244-248.
- Sánchez-Bel, P., Egea, I., Martínez-Madrid, C., Romojaro, F., Olmos, E., Flores, F. 2012. Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach. *Journal of Proteomics.* 75:5463-5478.
- Sapitnitskaya, M., Maul, P., Weiss, B., Samach, A. 2006. Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *J. Exp. Bot.* 57: 2943-2953.
- Sayyari, M., Valero, D., Babalar, M., Kalantari, S., Zapata, P. J., Serrano, M. 2010. Prestorage oxalic acid treatment maintained visual quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of pomegranate after long-term storage at 2°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 58:6804-6808.
- Scandalios, J.C. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant. Physiol.* 101: 7-12.
- Sceba, F., Sebastian, L., Vitagliano, C. 2001. Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. *Biol Plant.* 44: 41-46.
- Schirra, M. 1992. Behavior of "Star Ruby" grapefruit under chilling and non-chilling storage temperature. *Postharv. Biology. Technol* 2: 315.327.
- Schirra, M., D´hallewin, G. 1997. Storage performance of "Fortune" mandarins following hot water dips. *Postharv. Biology. Technol.* 10: 229-238.
- Selvarajah, S., Bauchot, A.D., John, P. 2001. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharv. Biology. Technol* 23:167-170.

- Serrano, M., Martínez-Madrid, C., Pretel, M.T., Riquelme, F., Romojaro, F. 1997. Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and ABA levels caused by chilling injury in pepper fruit. *J. Agr. Food. Chem.* 45: 1668-1672.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Martínez, G., Riquelme, F., Pretel, M.T. y Romojaro, F. 1996. Review: Role of polyamines in chilling injury of fruit and vegetables. *Food. Sci. Technol.* 2: 195-199.
- Serrano, M., Pretel, M.T., Martínez-Madrid, C., Riquelme, F., Romojaro, F. 1996. Conservación de calabacín en frío. Alteraciones fisiológicas. IV Congreso Nacional y I Ibérico sobre Maduración y Posrecolección de frutos y hortalizas. Valencia pp. 273-276.
- Serrano, M., Pretel, M.T., Martínez-Madrid, C., Romojaro, F., Riquelme, F. 1998. CO₂ treatment of zucchini squash reduces chilling-induced physiological changes. *J Agric and Food Chem.* 46:2465-2468.
- Sevillano, L. 2007. Expresión de proteínas de estrés de bajo peso molecular (sHSPs) en mesocarpo de chirimoya. Tesis Doctoral Universidad de Granada.
- Sevillano, L., Sanchez Ballesta, M.T., Romojaro, F., Flores, F. 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanism regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *J. Sci. Food. Agric.* 34: 145-152.
- Shapiro, F. 1985. Life for fresh vegetables and fruits in commercial storage. 3pp
- Shewfelt, R.L. 1986. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. *Food Technology* 5: 70-78.
- Shewfelt, R.L. 1990. Source of variation in the nutrient content of agricultural commodities from the farm to the consumer. *J. Food. Qual* 13:34-54.
- Shivratan, M. 2011. Physico-chemical, respiratory and fungicide residue changes in wax coated mandarin fruit stored at chilling temperature with intermittent warming. *Journal of Food Science and Technology.* 48:150-158.
- Sies, H., Krinsky, N.I. 1995. Antioxidat vitamins and B-carotene in disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 12995-13405.
- Silva, E.; Lourenco, E.J.; Neves, V.A. 1990. Soluble and bound preoxidases from papaya fruit. *Phytochemistry.* 29: 1051-1056.
- Singh, S.P., Pal, R.K. 2008. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Postharv. Biolo. Technol.* 47:296-306.
- Singh, S.P., Singh, Z., Swinny, E. E. 2009. Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina Lindl*). *Postharvest Biology and Technology.* 53:101-108

- Sisler, E.C., Blankenship, S.M. 1993a. Diazocyclopentadiene (DACP) a light sensitive reagent for the ethylene receptor in plants. *Plant.Growth. Reg.* 12:125-132.
- Sisler, E.C., Blankenship, S.M. 1993b. Effect of DACP on tomato ripening. *Plant.Growth. Reg.* 12:155-160.
- Sisler, E.C., Blankenship, S.M. 1996. Methods of counteracting an ethylene response in plants. U.S. 5,518,988. Patente Mayo 21.
- Sisler, E.C., Blankenship, S.M., Guest, M. 1990. Competition of cyclooctenes and cyclooctadienes for ethylene binding and activity in plants. *Plant Growth. Reg.* 9:157-164.
- Sisler, E.C., Dupille, E., Serek, M. 1996a. Effect of 1-MCP and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Reg.* 18:79-86.
- Sisler, E.C., Pian, A. 1973. Effect of ethylene and cyclic olefins on tobacco leaves. *Tob. Sci.* 17:698-72.
- Sisler, E.C., Serek, M. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100: 577-582.
- Sisler, E.C., Serek, M. 1999. Compounds controlling the ethylene receptor. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:1-7.
- Sisler, E.C., Serek, M., Dupille, E. 1996b. Comparison of cyclopropene, 1-MCP, and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. *Plant Growth. Reg.* 18:169-174.
- Sisler, E.C., Yang, S.F. 1984. Anti-ethylene effects of cis-2-butene and cyclic olefins. *Phytochemistry* 23: 765-768.
- Sola, M.D., Gutierrez, M., Vargas, A.M. 1994. Regulation of hexose-phosphate cycle determines glucose and fructose accumulation in cherimoya (*Annona cherimola Mill*) during ripening. *Journal of Plant Physiology* 144:569-575.
- Solomos, T. 1983. Respiration and energy metabolism in senescing plant tissues. En *Postharvest physiology and crop improvement*. Ed. Lieberman M. Pleum Press NY. Pp. 61-66.
- Soto-Zamora, G., Yahia, E.M., Brecht, J.K., Gardea, A. 2005. Effect of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. *LWT-Food. Sci. Technol.* 38:657-663.
- Tadeo, F.R., Gomez-Cadenas, A. 2008. Fisiología de las plantas y el estrés. En: Azcón-Bieto J, Talón M (eds.). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2 ed. Madrid, McGraw-Hill/Interamericana.
- Toivonen, P.M.A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *Hortscience.* 39: 938-942.

- Tatsumi, Y., Murata, T. 1981. Relation between chilling sensitivity of *Curcubitaceae* fruits and the membrane permeability. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 50: 108-113.
- Thompson G. A. Molecular changes in membrane lipids during cold stress. *Environmental Stress in Plants: Biochemical and Physiological Mechanisms*. NATO ASI series. Series G, Ecological sciences. - Berlin, Germany, 1989, vol. 19, p. 249-257
- Tiburcio, A.F., Figueras, X., Campos, J.L. 1993. Poliaminas. En *Fisiología y Bioquímica vegetal*. Ed. Azcón-Bieto J y Talón M. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid. p. 357-379.
- Toivonen, P. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *Hort. Science* 39: 938-942.
- Valdenegro, M. 2006. Influencia y control de los factores que influyen en la maduración, calidad y conservación del melón Piel de Sapo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Ines, D. 1994. S.O.D. In: Causes of photooxidative stress and amelioration of defence system in plant. Ed. Foyer CH. Boca Raton. Pp. 401-436.
- Van den Berg, R., Haenen, GR.M.M., Van den Berg, H., Bast, A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food. Chem.* 66: 511-517.
- Van der Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.* 80: 880-912.
- Van Lelyveld, L.J., Bower, J.P. 1984. Enzyme reaction leading to avocado fruit mesocarp discoloration. *J. Hortic. Sci.* 59: 257-263.
- Velazquez, M., Prieto, B., Contreras, R. 2004. Envejecimiento y radicales libres. *Ciencias* 75: 37-43.
- Venereo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana. Med. Milit.* 31:126-133
- Vicente, A.R., Pineda, C., Lemoine, L., Chaves, A.R. 2005. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biology and Technology.* 35:69-78.
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C. 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant-species. *Plant Physiology.* 75:458-461.
- Vieling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plant. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology.* 42: 579-620.

- Vinocur, B., Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievement and limitation. *Current Opinion in Biotechnology* 16:123-132.
- Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A.F. 1997. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant. Physiol* 113: 1009-1013.
- Walsh, C.S., Daberkow, P.N., Hoffman, N., Follin, K., Lane, H., McDowell, E.F. 2002. The effects of chilling temperatures on juiciness and ethylene evolution in peach fruit. *Proceedings of the 5th International Peach Symposium, Vols 1 and 2. Acta Horticulturae*. Pp 629-633.
- Wang, C.Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plant to chilling stress. *Hortscience*. 17:173-186.
- Wang, C.Y. 1989. Chilling injury of fruit and vegetables. *Food international* 5: 209-236.
- Wang, C.Y. 1989. Relation of chilling stress to ethylene production. In *Low temperature stress physiology in crops*. Ed. Paul H. Li. CRC Press Boca Raton Fl. p 177-189.
- Wang, C.Y. 1991. Effect of ABA on chilling injury of zucchini squash. *J of Plant Growth Regulation*. 10: 101-105.
- Wang, C.Y. 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Hort. Rev.* 15:63-95.
- Wang, C.Y. 1993. Relation of chilling stress to polyamines in zucchini squash. *Acta Horticulturae*. 343: 288-289.
- Wang, C.Y. 1994. Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharv. Biol. Technol.* 4:65-73.
- Wang, C.Y. 1994. Chilling injury of tropical horticultural commodities. *Hort Science*. 29:986-988.
- Wang, C.Y. 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest. Biol. Technol.* 5: 67-76.
- Wang, C.Y. 1995. Temperature preconditioning affects glutathione content and glutathione reductase activity in chilled zucchini squash. *J Plant Physiology*. 145: 148-152.
- Wang, C.Y. 1995a. Relationship between free radical scavenging and chilling tolerance in zucchini squash. *Acta Horticulturae*. 398: 205-213.
- Wang, C.Y. 1995b. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and SOD in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*. 5: 67-76.
- Wang, C.Y. 1996. Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology* 8:29-36.

- Wang, C.Y. 1999. Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharv. Biol. Technol.* 4: 65-73.
- Wang, C.Y. 2000. Postharvest techniques for reducing low temperature injury in chilling sensitive commodities. Ed Improving Postharvest Technologies Vegetables and Ornamentals. Ed. F Artes, Gil M.I, Conesa MA. II: 467-473.
- Wang, C.Y. 2006.Reducing chilling injury and maintaining quality of horticultural crops with natural products and their derivates. *Acta Horticulturae.* 712:285-290.
- Wang, C.Y., Adams, D.O. 1982. Chilling induced ethylene production in cucumbers. *Plant Physiol.* 69: 424-429.
- Wang, C.Y., Buta, J.G. 1994. Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Cucurbita pepo* through its regulation of ABA and polyamine levels. *Environmental and Experimental Botany.* 34: 427-432.
- Wang, C.Y., Buta, J.G. 1999. Methyl jasmonate improves quality of stored zucchini squash. *J of Food Quality.* 22:663-670.
- Wang, C.Y., Ji, Z.L. 1989. Effect of low oxygen storage on chilling injury and polyamines in zucchini squash. *Scientia horticulturae* 39: 1-7.
- Wang, C.Y., Kramer, G.F., Whitaker, B.D., Lusby, W.R. 1992. Temperature preconditioning increase tolerance to chilling injury and alters lipid composition in zucchini squash. *J Plant Physiology* 140:229-215.
- Wang, C.Y., Qi, L. 1997. Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers. *Postharv. Biol. Technol.* 10: 195-200.
- Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., Archbold, D.D. 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharv. Biol. Technol.* 41: 244-251.
- Wang, S.Y.,Ballington, J.R. 2007. Free radical scavenging and antioxidant enzyme activity in deerberry (*Vaccinium stamineum L.*). *LWT,* 40:1352-1361.
- Wang, Y., Lu, W., Luo, Y., Joyce, D. 2006. Expression of ethylene related expansin genes in cool-stored ripening banana fruit. *Plant Sci.* 170: 962-967.
- Wang, Y.W., Adams, D.O. 1980. Chilling induced ethylene production in cucumbers. *Plant Physiol.* 69: 424-427.
- Wang, YW., Adams. DO. 1980. Ethylene production by chilled cucumbers. *Plant Physiol* 66:841-843.
- Washko, P.W., Welch, R., Wang, Y., Levine, M. 1992. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples. *Anal. Biochem.* 204: 1-14

- Water, E.R., Lee, G.J., Vierling, E. 1996. Evolution structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* 47:325-338
- Weber, P., Bendich, A., Schalch, N. 1996. Vitamin C and human health, a review of recent data relevant to human requirements. *Int. J. Vitamin Nutr. Res* 66: 19-30.
- Whitaker, B.D. 1992. Changes in galactolipid and phospholipid levels of tomato fruits stored at chilling and non-chilling temperatures. *Phytochemistry* 31:2627-2630.
- Whitaker, B.D. 1995. Lipids changes in mature green bell pepper fruit during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling. *Physiol Plant* 93:683-688.
- Wijeratnam, R. S., Hewajulige, I. G. N., Wijesundera, R. L. C., Abeysekere, M. 2006. Fruit calcium concentration and chilling injury during low temperature storage of pineapple. *Proceedings of the Vth International Pineapple Symposium. Acta horticulturae.* Pp 203-208.
- Willeken, H., Chamnongpal, S., Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plant. *EMBO J* 16: 4806-4816.
- Wills, K., Mc Glason, B., Graham, D., Joyce, D. 1998. *Postharvest: A introduction to the physiology and handling of fruits.* UNSW Press 4th edition 262 pp.
- Wimalasiri, P., Wills, R.B.M. 1983. Simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 256:368-371.
- Wong, W.S., Ning, W., Xu, P.L., Kung, S.D., Yang, S.F., Lin, H. 1999. Identification of two chilling-regulated ACC sintetasa genes from citrus fruit. *Plant. Mol. Bio.* 41:587-600.
- Wood, C.M., Reid, B.D. 1984. Response to chilling stress in plant cells: redistribution of intra cellular calcium. *Protoplasma* 121: 17-24.
- Wood, J.E., Senthilmohan, S.Y., Peskin, A.V. 2002. Antioxidant activity proacyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry.* 77: 155-161.
- Woolf, A.B., Requejo-Tapia, C., Gunson, A., Arpaia, M.L., White, A. 2005. 1-MCP reduces physiological storage disorders of "Hass" avocados. *Postharvest Biology and Technology.* 35:43-60.
- Woolf, A.B., Watkins, C.B., Bowen, J.H., Ferguson, I.B. 1995. Reducing external chilling injury in stored "Hass" avocados with dry heat treatment. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 1050-1056.
- Yang, H., Wu, F., Cheng, J. 2011. Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response. *Food Chemistry.* 127:1237-1242.
- Yang, Q., Rao, J., Yi, S., Meng, K., Wu, J., Hou, Y. 2012. Antioxidant enzyme activity and chilling injury during low-temperature storage of Kiwifruit cv. "Hongyang" exposed to gradual postharvest cooling. *Horticulture Environment and Biotechnology.* 53:505-512

- Yuen, C.M.C., Tridjaja, N.O., Will, R.B.H., Wild, R.L. 1995. Chilling injury development of Tahitian lime, Emperor mandarin, Marsh grapefruit and Valencia orange. *J. Food and Agric.* 67:335-339.
- Zacarias, L., Lafuente, M.T., Marcos, J.F., Saladie, M., Dupille, E. 2003. Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive "Fortune" mandarin fruit. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III. NATO Science Series, sub-series I: Life and Behavioral Sciences.* 349:112-117.
- Zagory, D., Kader, A.A. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food. Technol.* 42:70-77.
- Zaharah, S.S., Singh, Z. 2011. Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored "Kensington Pride" mango. *Postharvest Biology and Technology.* 60:202-210.
- Zamorano, J.P., Alique, R., Canet, W. 1999. Mechanical parameters to assess quality changes in cherimoya fruit. *Z. fur. Lebensmittel. Food. Research. Technology.* 208: 125-129.
- Zauberman, G., Fuchs, Y., Rot, I., Wexler, A. 1988. Chilling injury, peroxidase and cellulase activities in the peel of mango fruit at low temperature. *Hort Science.* 23: 732-733.
- Zhou, H.W., Lurie, S., Ben-Arie, R., Dong, L., Burd, S. 2001. Intermittent warming of peaches reduces chilling injury by enhancing ethylene production and enzymes mediated by ethylene. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 76:620-628.
- Zhu, L-Q., Zhou, J., Zhu, S-H. 2010. Effect of a combination of nitric oxide treatment and intermittent warming on prevention of chilling injury of "Feicheng" peach fruit during storage. *Food Chemistry.* 121:165-170.